

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO**  
**CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA**

**BRUNO DUARTE BERTULOSO**

**ESTUDOS DOS EFEITOS MORFOFISIOLÓGICOS DA  
EXPOSIÇÃO CRÔNICA AO TRIBUTIESTANHO  
SOBRE O TECIDO ADIPOSEO BRANCO E HEPÁTICO  
DE RATAS**

Vitória  
2013

**BRUNO DUARTE BERTULOSO**

**ESTUDOS DOS EFEITOS MORFOFISIOLÓGICOS DA  
EXPOSIÇÃO CRÔNICA AO TRIBUTIESTANHO  
SOBRE O TECIDO ADIPOSEO BRANCO E HEPÁTICO  
DE RATAS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr.

Jones Bernardes Graceli

Vitória  
2013

# **TRIBUTILESTANHO ALTERA TECIDO ADIPOSEO BRANCO E HEPÁTICO DE RATAS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Biotecnologia.

Apresentada em 30 abril de 2013.

---

**Prof. Dr. Jones Bernardes Graceli**  
**Universidade Federal do Espírito Santo**  
**Orientador**

---

**Prof. Dr. Leandro Miranda-Alves**  
**Universidade Federal do Rio de Janeiro**  
**Examinador externo**

---

**Prof. Dr. Helder Mauad**  
**Universidade Federal do Espírito Santo**  
**Examinador interno**

Vitória, 2013

## **AGRADECIMENTOS**

A minha família, em especial minha mãe e meu pai, pelo carinho, apoio, atenção e amor. Ao meu irmão pela atenção e ajuda nos momentos mais difíceis.

Aos amigos e parceiros de longa data – Pedro, Henrique, Gabriela, Isabela – por me darem apoio desde a graduação.

Aos amigos e companheiros de laboratório – Eduardo, Jéssica, Emilly, Julia, Mayara – pelo carinho, atenção e apoio.

A Priscila, que sempre me orientou, ajudou e passou o conhecimento com tanto carinho e atenção.

A Professora Célia e a Doutoranda Miriane, pela colaboração nos experimentos.

Ao Diego, meu “Personal Western Blotting”, por sempre ter me ajudado nos momentos difíceis de experimento.

Ao Professor Emilio, pela amizade, ensino e atenção muitas vezes nos momentos mais delicados de um mestrado.

Ao Jones, grande orientador, que sempre me ajudou e apoiou nas inúmeras vezes que precisei – ensinando sobre a vida e a pesquisa.

Ao programa de Pós-graduação em Biotecnologia.

A UFES, FAPES, CAPES e CNPq, pelo apoio financeiro.

## RESUMO

Triorganoestânicos, principalmente o tributilestanho (TBT), são contaminantes ambientais organometálicos, comumente usados em tintas anti-incrustantes para embarcações, que sofrem bioacumulação e, portanto, podem ser encontrados em mamíferos e seres humanos, devido à ingestão de dietas contaminadas. A importância do TBT como desregulador endócrino ambiental e sua toxicidade reprodutiva em diferentes modelos animais é bem conhecida. No entanto, os efeitos adversos sobre a função metabólica de mamíferos não são bem compreendidos. O potencial tóxico do TBT no tecido adiposo branco e hepático de ratas com ciclo reprodutivo regular de ratas foi examinado. Ratas Wistar com 12 semanas de idade, pesando aproximadamente 230 g foram divididas em dois grupos: Controle (tratadas com veículo, 0.1% solução etanólica) e TBT (tratadas com tributilestanho, 100ng/Kg/dia). O tratamento durou 15 dias. O TBT aumentou o peso corporal no final do 15º dia de exposição, estimulando as massas das gorduras parametriaes e retroperitoneais. Análise histológica mostrou hipertrofia nestes tecidos adiposos parametrial 14,5% e retroperitoneal 15,7%. TBT aumentou expressão do receptor de estrogênio alfa em 31,0 % e 46,0 % nas gorduras parametriaes e retroperitoneais, respectivamente ( $p < 0.01$ ). Não encontramos alteração dos valores séricos de colesterol total, porém houve um aumento nos valores de TGO (transaminase glutâmico oxalacética) e TGP (transaminase glutâmico pirúvica) ( $p < 0.05$ ) após exposição ao TBT. Encontramos aumento na deposição de gotículas de lipídios (após coloração de *Oil red*), na fração de granuloma e na expressão da proteína ED1 de macrófagos hepáticos, após exposição ao TBT. Após exposição de 24h em células 3T3L1, TBT (10nM) aumentou, estrogênio ( $10^{-7}$ M) reduziu a deposição lipídica (*Oil red*) vs controle. Estes efeitos foram atenuados após a exposição com o inibidor dos receptores de estrogênio (ICI 182780). Estes dados sugerem que o TBT pode estimular o tecido adiposo branco de forma específica *in vivo*, via o RE- $\alpha$  e *in vitro*, via RE, e, alterar a função metabólica hepática, contribuindo para modificação na função metabólica.

**Palavras-chave:** Tributilestanho; Poluição ambiental; Toxicidade; Desregulação endócrina; Função metabólica.

## ABSTRACT-

Triorganotins, mainly tributyltin (TBT), are environmental contaminants, commonly used in antifouling paints for boats, which suffer bioaccumulation and thus are found in mammals and humans due to ingestion of contaminated food. The importance of TBT as environmental endocrine disrupter and consequent reproductive toxicity in different animal models is well known. However, the adverse effects upon metabolic function are less well understood. The potential toxicity of TBT in white adipose tissue and liver from regular reproductive cyclicity of female rats was examined. Wistar female rats at 12 weeks of age, weighing approximately 230 g were divided in two groups: Control (treated with vehicle, 0,1% ethanol solution), and TBT (treated with tributyltin, 100 ng/kg/d). The treatment lasted 15 days. TBT-treatment increased the weight body of 15th day associated with elevated in parametrial and retroperitoneal fat pads. After histology analysis, TBT-exposure showed significant increase of mean adipocyte diameter in parametrial and retroperitoneal in 14.5 % and 15.7%, respectively ( $p<0.01$ ). TBT-treated rats showed high expression of RE- $\alpha$  expression in the parametrial and retroperitoneal in 31.0 and 46.0%, respectively ( $p<0.01$ ). The value of cholesterolemia was similar to control, but the elevated the serum (TGP) glutamic pyruvic transaminase and serum (TGO) glutamic-oxaloacetic transaminase ( $p<0.05$ ). In liver TBT-treated, we showed increased in lipid droplets while after oil red staining, the fraction area of granuloma and ED1 protein expression from macrophages ( $p<0.05$ ). In 3T3-L1 cells, the estrogen-treated (E2, 10-7M) reduced and TBT-treated (10 nM) increased lipid droplets while. The E2 + TBT-treated has similar effect to E2, but it was low to control ( $p<0.05$ ). The ER antagonist ICI-182,780 inhibits this effect in both treatment (E2 and TBT) and it was low to control ( $p<0.05$ ). These findings suggest that the toxic potential of TBT can stimulate white adipose tissue specifically (*in vivo*) by RE- $\alpha$  and, *in vitro*, by RE. Also, TBT-exposure alters the metabolic function of the liver, contributing to changes in metabolic function associated to metabolic risks development.

Key words: Tributyltin; Environmental pollution; Toxicity; Endocrine disruption; Metabolic function.





## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Peso corporal diário de animais controle e expostos ao TBT por 15 dias.....	30
Figura 2 - Efeito do tratamento com TBT sobre: Tecido adiposo parametrial.e retroperitoneal .....	32
Figura 3 – Diâmetro médio de adipócitos de animais controle e expostos ao TBT por 15 dias.....	33
Figura 4 - Expressão proteica do receptor de estrogênio alfa (ER- $\alpha$ ) no tecido adiposo parametrial e retroperitoneal .....	35
Figura 5 - Deposição de gotículas de lipídios nas células 3T3L1 expostas ao TBT e ao estrogênio .....	37
Figura 6 – Histologia de tecido hepático de animais controle (A) e após exposição ao TBT (B e C).....	38
Figura 7- Expressão da proteína de macrófagos ED1 no tecido hepático de animais controle e tratados com TBT.....	40
Figura 8- Coloração de <i>Oil red</i> no tecido hepático de animais controle e tratados com TBT.....	41

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Concentração de hormônios sexuais femininos, perfil lipídico, taxas de enzimas hepáticas.....	31
--	----

## LISTA DE SIGLAS

BSA	Albumina soro bovino
CON	Controle
DBT	Dibutilestanho
H&E	Hematoxilina e eosina
IMO	International maritime organization
LH	Hormônio luteinizante
MBT	Monobutilestanho
PBS	Tampão fosfato-salina
PVC	Cloreto de polivinila
ER	Receptores de estrogênio
ER- $\alpha$	Receptor de estrogênio alfa
ER- $\beta$	Receptor de estrogênio beta
SDS	Dodecil sulfato de sódio
Sn	Estanho inorgânico
TBT	Tributilestanho
TBTA	Acetato de tributilestanho
TBTCl	Cloreto de tributilestanho
TBTOH	Hidróxido de tributilestanho
TBTO	Óxido de tributilestanho
TPT	Trifenilestanho
TPTCl	Cloreto de trifenilestanho

## SUMÁRIO

<b>1-INTRODUÇÃO.....</b>	<b>12</b>
<b>2-OBJETIVOS .....</b>	<b>20</b>
2.1 Objetivo geral.....	20
2.2 Objetivos específicos.....	20
<b>3 METODOLOGIA.....</b>	<b>21</b>
3.1 Grupos experimentais.....	21
3.2 Eutanásia e Dosagem Hormonal.....	22
3.3 Retirada e Pesagem dos Órgãos.....	22
3.4 Análise Histológica.....	23
3.4.1 Morfometria do tecido adiposo branco.....	23
3.4.2 Morfometria de tecido hepático.....	24
3.5 Extração e Dosagem de Proteínas.....	24
3.6 Cultura de células e diferenciação.....	25
3.7 Coloração com <i>Oil red</i> das células 3T3-L1 e do tecido hepático .....	26
3.7.1 Coloração Cultura.....	26
3.7.2 Coloração tecido hepático.....	27
3.8 Western Blotting (Immunoblotting).....	27
<b>4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>29</b>
4.1 Peso corporal diário, dosagem Hormonal.....	29
4.2 Pesos úmidos de tecidos adiposos.....	31
4.3 Morfometria dos tecidos adiposos ( <i>in vivo</i> ).....	33
4.4 Western Blotting (Immunoblotting).....	34
4.5 Efeitos do TBT in vitro.....	35
4.6 Parâmetros hepáticos.....	38
4.6.1 Análise histológica.....	38
4.6.2 Western Blotting ED1.....	39
4.6.3 Coloração de <i>oil red</i> hepática.....	40
<b>5 CONCLUSÕES.....</b>	<b>42</b>
<b>6 REFERÊNCIAS .....</b>	<b>43.</b>

## 1. INTRODUÇÃO

O estanho (Sn) metálico apresenta importância desde a era do bronze onde era utilizado em ligas metálicas (RUDEL, 2003). Por outro lado os compostos organoestânicos (OTs) foram conhecidos apenas a cerca de 150 anos (HOCH, 2001), tendo seus primeiros estudos realizado por Sir Edward Frankland (1825-1899) (BLUNDEN et al., 1990). A maioria destes compostos tem origem antropogênica, exceto os metilestanhos, que podem ser produzidos por biometilação, oriunda de processo natural de ação microbiana (GUARD et al., 1981). As primeiras utilizações comerciais dos OTs foram na década de 1940 nas indústrias de produção do cloreto de polivinila (PVC) (HOCH, 2001). Além da propriedade estabilizadora de polímeros, como o plástico, os OTs possuem atividade biocida, que fora descoberta em 1950, na Holanda (LUITJEN, 1987). No nível molecular outra característica importante dos organoestânicos é o comprimento das cadeias de alquilo ligadas ao estanho. E o numero de cadeias tem efeito em suas propriedades físico-químicas (IPCS,1990). Desta maneira, os efeitos tóxicos dependem da natureza química e do número de grupos orgânicos associados ao átomo de estanho. Cumpre mencionar que sua ação tóxica máxima, normalmente, ocorre em compostos com três grupos orgânicos ou trissubstituídos, como o tributilestanho (TBT) e/ou o trifenilestanho (TPT). Portanto, o TBT é amplamente utilizado como biocida em geral (BENNET, 1996; HOCH, 2001).

Os OTs apresentam caráter hidrofóbico Assim sua solubilidade e dependente de fatores como o pH, a força iônica e a temperatura (FENT, 1996; HOCH, 2001). Em solução aquosa, a forma iônica do TBTH encontra-se em equilíbrio com as formas TBTOH (hidróxido de tributilestanho) e TBTCI (cloreto de tributilestanho) e tem valores de pKa que são mais baixos do que os encontrados no ambiente natural (ALZIEU, 1998; RUDEL, 2003).

Em ambientes marinhos, o TBT encontra-se principalmente na forma TBTOH. Assim sua biodisponibilidade se torna maior sob tal forma quando o pH é maior que 8 (ALZIEU, 1998; FENT, 1996). Nesses ambientes, devido a baixa solubilidade e

mobilidade, os triorganoestânicos podem ser facilmente adsorvidos ao material particulado em suspensão dos sedimentos superficiais (LANGSTON; POPE, 1995; HOCH, 2001). GADD (2000) afirma que aproximadamente 95% do TBT presente na coluna d'água está ligado ao material em suspensão, incluindo o plâncton. Enquanto os 5% restantes estão amplamente associados à matéria orgânica dissolvida, ligantes orgânicos e inorgânicos. Dessa maneira a adsorção pode ser considerada um processo de destino do TBT nos sistemas aquáticos entrando nos níveis tróficos (HOCH, 2001).

O cobre foi o principal componente metálico utilizado em tintas anti-incrustante, mas com o desenvolvimento de novos biocidas o controle da bioincrustação foi assumido pelos OTs, desse modo atividade biocida do TBT gerou interesse na indústria naval substituindo assim as tintas a base de cobre (HOCH, 2001; MENG et al., 2009). Segundo Bennett (1996), mesmo existindo no mercado marítimo inúmeras alternativas de biocida, a constatada ação dos organoestânicos especialmente os triorganoestânicos (DELGADO FILHO et al., 2011), Nesse sentido o TBT, torna o principal composto utilizado no mundo em tintas anti-incrustantes. Contudo não existia a percepção deste composto como poluente ambiental. Acreditava-se que fosse o biocida ideal, devido sua fácil degradação, que pode ocorrer pelo uso de ácidos, ação de microalgas e bactérias presentes no ambiente marinho e pela luz ultravioleta, proveniente da radiação solar ao longo da coluna d'água (GADD, 2000; HOCH, 2001; OMAE, 2003). Das várias aplicações do TBT, a maior percentual de OTs para ambientes aquáticos é oriunda de tintas anti-incrustantes. O TBT quando lançado no meio ambiente, degrada-se em dibutilestanho (DBT), monobutilestanho (MBT) e a degradação final é o estanho inorgânico (Sn), estável. (RUDEL, 2003).

A ação biocida do TBT é complexa e sua atividade é dependente de vários fatores, tais como o seu grau de toxicidade, o teor de matéria orgânica presente ambiente poluído, o tempo de exposição, a concentração liberada, a biodisponibilidade e a persistência destes compostos químicos antes da total degradação (OLIVEIRA; SANTELLI, 2010; Pinochet et al., 2009).

No início da década de 70 surgiu o primeiro relato dos efeitos prejudiciais que o uso do TBT em organismos não-alvos (ALZIEU, 1998), conferindo assim um caráter de poluente/tóxico ambiental. Devido essa característica estudos ecotoxicológicos

mundiais foram e/ou estão sendo conduzidos com a finalidade de comprovar a extrema toxicidade do TBT ao longo dos diferentes níveis tróficos e modelos experimentais. Tais preocupações se justificam pelo fato de no início da década de 90 cerca de 80% barcos de grande porte já usavam algum tipo de tinta a base de OTs (IMO, 1999). Acredita-se que incrustações de 10 mm possa aumentar o consumo de combustível em torno de 0,3 a 1% (FELIZZOLA, 2005) dando assim um aumento significativo no custo. Devido o aumento nos custos houve intensa utilização do TBT nas tintas anti-incrustantes. Mas, apesar dessa eficiência OTs foram considerados os agentes químicos mais tóxicos para organismos sensíveis introduzido deliberadamente nos ecossistemas marítimos (HOCH, 2001). É importante ressaltar que a entrada desses compostos no meio aquático pode ocorrer por outras diferentes fontes potenciais, tais como águas residuais municipais, industriais, lodo de esgoto e o escoamento superficial (LEE et al., 2006).

As primeiras regulamentações adotadas no uso do TBT, como biocida nas tintas anti-incrustantes surgiram em 1982, pelo Ministério do Ambiente Francês, com a finalidade de reduzir sua utilização (ALZIEU, 1998). No entanto, esta diminuição não foi generalizada, devido à importância econômica dessas tintas para as indústrias que utilizam o transporte marítimo mundial (LIU et al., 1997).

Muitas investigações científicas comprovaram o alto grau de toxicidade do TBT para várias espécies em filamentos distintos e sensibilizaram, em parte, a indústria naval para elaborar restrições ou proibições de sua utilização (Organização Marítima Internacional, IMO). No Brasil, no ano de 1992, em uma conferência realizada no Rio de Janeiro, foi adotado o “Princípio da Precaução” (Agenda 21. Seção 17.22), ficando então acordado a proibição total do uso do TBT a partir de 1º de Janeiro de 2003. Além disso, em 2001, a IMO adotou um decreto, que segundo o qual, tintas a base de TBT teriam que ser removidas ou seladas dos cascos das embarcações até Janeiro de 2008 (IMO, 1999). Mesmo com a proibição legislativa e devido a sua alta toxicidade, entre o início da década de 90 até ano de 2003, estima-se que 70% dos navios do mundo ainda utilizavam o TBT sob a forma de copolímero (SWENNEN et al., 1997), e os prejuízos relacionados ao uso do TBT ainda são evidentes, pela sua deposição em sedimentos superficiais do ecossistema aquático e bioacumulação



nos organismos, demonstrado nas investigações ecotoxicológicas (PLETSCH et al, 2010).

A ação dos OTs tem atividade cito, neuro e genotóxica em diferentes modelos animais de invertebrados (cracas, gastrópodes, etc) e vertebrados (peixes, roedores e homem). Estas ações são capazes de afetar o metabolismo destes animais, com alterações morfofuncionais macroscópicas, modificando seu comportamento ecológico, afetando sua reprodução e alterando parâmetros relacionados à sua biodiversidade, reduzindo sua adaptação ao meio ambiente (KOVALCHUCK et al., 1998). Deste modo, alguns moluscos gastrópodes são usados como bioindicadores ambientais (OHHIRA et al., 2003; DELGADO FILHO et al., 2010; GRACELI et al., 2012), devido sua capacidade reduzida de metabolização deste contaminante.

Esse caráter tóxico causado pelo TBT ocasiona o desenvolvimento sexual anormal, devido à desregulação endócrina em algumas espécies de gastrópodes (MATTHIESSEN et al., 1995). Essa desregulação em algum organismo pode causar um fenômeno chamado de “imposex”, ou seja, uma superposição de órgãos genitais masculinos em fêmeas. Quando isso ocorre acarreta uma síndrome endócrina irreversível até então, provocando a esterilização das espécies (dependendo do grau de contaminação), podendo levar a uma diminuição considerável nas populações mais sensíveis, tornando-os excelentes bioindicadores de contaminação por organoestânicos em ecossistemas marinhos (COSTA et al., 2008). Outras pesquisas demonstram a relação do TBT com prejuízos fisiológicos nos hormônios sexuais em gastrópodes, principalmente pela alteração na atividade da aromatase (SCHULTE-OEHLMANN et al., 1995; OEHLMANN et al., 1998).

Triorganoestânicos são poluentes organometálicos, com características de desreguladores endócrinos. O termo “desregulador endócrino” foi o primeiro utilizado por Ana Soto e colaboradores (1993), quando identificaram uma série de efeitos sobre o desenvolvimento de animais selvagens e seres humanos (COLBORN et al., 1993). São classificados como desreguladores endócrinos, os compostos exógenos com potencial para alterar a modulação hormonal (direta ou indiretamente) e do sistema endócrino como um todo, podendo afetar, a função reprodutiva e metabólica de animais e seres humanos e, conseqüentemente a saúde (USEPA, 2000). Estes compostos podem promover uma alteração na produção, liberação, mecanismos de

ação, metabolismo, eliminação, e ainda, podem mimetizar a ação de hormônios naturais (TABB; BLUMBERG, 2006).

Brown et al. (2001) e BILA e DEZOTTI (2007) afirmam que os desreguladores endócrinos podem atuar sobre uma glândula endócrina, alterando as suas funções direta e/ou sobre a expressão de um receptor hormonal. A exposição aos compostos organoestênicos induz modificações fisiológicas como prejuízos no metabolismo dos hormônios sexuais em roedores (OMURA et al., 2001; GROTE et al., 2004; GROTE et al., 2006; KISHTA et al., 2007). Sabe-se que esteróides ovarianos, em especial o estradiol, estão ligados a modulação da função reprodutiva e metabólica (SANTOS et al., 2012). Outros trabalhos vêm demonstrando que glândulas de mamíferos, como o pâncreas, pituitária, gônadas (masculina e feminina) e a tireóide sofrem mudanças em suas funções quando são expostas ao TBT (WADA et al., 1982; OBERDÖRSTER et al., 1998; VOS et al., 2000).

A maioria dos desreguladores endócrinos são derivados de compostos químicos, de origem animal, humana ou vegetal. Mas a maior parte da preocupação da toxicidade desses compostos é de produtos/ metabólitos químicos com capacidade de desregulação endócrina já conhecida (CASALS-CASAS; DESVERGNE, 2011). Apesar dos desreguladores poderem atingir diferentes sistemas endócrinos, o seu prejuízo maior prejuízo pode estar, quando a exposição ocorre, nas primeiras fases embrionárias, alterando o desenvolvimento reprodutivo, metabólico, na diferenciação celular, tecidual, sistêmica e funcional, modificando a programação fetal, em geral por intercorrências nas ações hormonais (CASALS-CASAS; DESVERGNE, 2011).

A bioacumulação dos OTs ao longo de cadeias alimentares estão relacionados a diferentes prejuízos funcionais em mamíferos, como modificações metabólicas *in vivo* e *in vitro* (GRÜN; BLUMBERG, 2006; GRACELI et al., 2012), desenvolvimento de fatores de risco cardiovasculares, principalmente coronarianos (Santos et al., 2012), e disfunções reprodutivas (Delgado Filho et al., 2011; Podratz et al., 2012; GRACELI et al., 2013). Estudos bioquímicos demonstram que o TBT diminui a atividade da aromatase P450, o passo-chave na conversão de androgênios em estrogênios, com um consequente aumento na testosterona e diminuição dos níveis de estrogênio (MATTHIESSEN; GIBBS, 1998; SAITOH et al., 2001; NAKANISHI et al., 2005) e o aumentando os níveis de testosterona, prejudicando o desenvolvimento

sexual de ratos e alteração no controle do eixo hipotálamo hipófise (GROTE et al., 2004). Ou ainda, modificando o equilíbrio dinâmico destas reações esteroidogênicas e acarretando um aumento nos níveis séricos de progesterona, diminuindo o peso uterino, a taxa de gravidez, e número de implantes em ratas pseudográvidas (EMA; MIYAWAKI, 2002). Dessa maneira a desregulação endócrina pelos organoestênicos é baseada em suas ações diretas/indiretas sobre a função glandular como um todo, bem como modificações às funções mitocondriais e subsequentes respostas de estresse celular ( PHILBERT et al., 2000; HEIDRICH et al., 2001).

Estudos de programação fetal demonstram que a alteração na nutrição materna, estímulos ambientais diferenciados, estresse, dentre outros durante o período pré-natal e pós-natal desencadeie processos celulares que irão originar mudanças morfofuncionais, aumento suscetibilidade e sensibilidade a diferentes tipos de doenças crônicas (BERTRAM; HANSON, 2001; GLUCKMAN et al., 2008). Em ambientes marinhos, essa desregulação endócrina que reduz a atividade da aromatase, em espécies de moluscos gastrópodes pode aumentar o nível de testosterona causando assim imposex (OBERDORSTER; MCCLELLAN-GREEN, 2002). Outra influencia causada por este xenobiótico seria uma desregulação metabólica em modelos de mamíferos, aumentando a deposição lipídica, estimulando o tecido adiposo branco e modulando fatores relacionados com o surgimento da obesidade in vivo e in vitro (GRUN; BLUMBERG, 2007; CASALS-CASAS et al., 2008; GRUN; BLUMBERG, 2006). TBT promoveu adipogênese em camundongos e em cultura celular de pré-adipócitos 3T3-L, onde tal trabalho analisou o acúmulo de lipídio por *Oil red* após a maturação dos adipócitos (GRUN et al., 2006). Outra afirmação do efeito do TBT é um indutor na acumulação de lipídios e ácido graxos em espécies de pequenos gastrópodes, como a *Marisa cornuarietis* (JANER, 2007).

Perturbações metabólicas similares foram observadas IGUCHI E KATSU (2008), quando afirmaram que o TBT é forte agonista dos receptores nucleares do tipo receptor retinóide X (RXR, principalmente a isoforma RXR $\alpha$ ), e receptor ativado por proliferadores de peroxissoma gama (PPR $\gamma$ ) (GRUN; BLUMBERG, 2006) em concentrações nanomolares em espécies de vertebrados, como ratos e anfíbios (*Xenopus laevis*) invertebrados como molusco gastrópodes

ocasionando perturbações metabólicas. GRÜN E BLUMBERG (2007) e afirmaram que o efeito adipogênico exercido pelo o TBT não se restringe somente a estágios fetais.

O tecido adiposo (branco e marrom) é um sistema endócrino que desempenha um papel na homeostase de energia, térmica, no metabolismo de lipídios, na esteroidogênese, na resposta imune e a função reprodutiva, dentre outras (KERSHAW; FLIER, 2004; GUERRE-MILLO, 2002; BADMAN; FLIER, 2005, MACLAREN et al, 2008; MONGET et al., 2008). O estrogênio é um esteroide ovariano, que participa principalmente no controle na função reprodutiva, porém estudos demonstram seu efeito modulador no do tecido adiposo como regulador da adipose em ambos os sexos (COOKE; NAAZ, 2004). Regulação essa que ocorre via receptor de estrogênio ER, que pode ser alterada dependente do estado fisiológico e do tecido específico (PERDERSEN et al., 1991).

Em humanos e ratos tecido adiposo expressa ambos os ER- $\alpha$  e ER- $\beta$  (PEDERSEN et al., 2001; NAAZ et al., 2002), desse modo afirmando que o tecido adiposo é responsivo ao estrogênio e expressa os ER- $\alpha$  e ER- $\beta$  para este hormônio em roedores e humanos (PEDERSEN et al., 1996; NAAZ et al., 2001). Contudo, a modulação da lipogênese no tecido adiposo é influenciada principalmente pela atividade do receptor  $\alpha$  (HEINE et al., 2000).

Desta forma, há um aumento de deposição de tecido adiposo em mamíferos pode ser dirigida a baixa de estrogênio, como observada em mulheres em menopausa, caracterizando uma das ações do estrogênio como um caráter anti-adipogênico (KORACH, 2000;. DANILOVICH et al, 2000; MURATA et al, 2002;. HEINE et al, 2000). O estrogênio regula a deposição/ proliferação da massa de gordura, aumentando a lipólise através da modulação da expressão de genes como o da LPL lipoproteína lipase (HOMMA et al, 2000) que regulam a deposição de tecido adiposo (lipogênese), o metabolismo e a diferenciação dos adipócitos (PALLOTTINI et al, 2008;. COOKE ; NAAZ, 2004). NEWBOLD et al (2009) observou que DES (agonista sintético para receptor de estrogênio) estimulava a deposição de gordura corporal total em ratos.

Esse complexo entendimento pode ser apoiado por estudos feitos com, 4,4'-isopropylidenediphenol ou bisfenol A (BPA), substância química que se comporta como estrogênio, um dos efeitos é dito por NADAL et al., (2005) quando ele relaciona a ação endócrina dessa substância reguladas pelos receptores nucleares ER $\alpha$  e ER $\beta$ . DOURADO et al., (2011) demonstrou que Bisfenol-A aumenta a expressão de ER- $\alpha$  em células epiteliais de glândulas mamárias. *In vitro* esse composto promove proliferação e diferenciação de pré-adipócito 3T3-L1 (MASUNO, 2002).

Embora haja alguns trabalhos demonstrando ações de xenobióticos sobre as diferentes funções endócrinas, poucos estudos demonstram o efeito do TBT na função metabólica. Que podem ter origem na inibição da enzima aromatase ou sobre efeitos na via de alguns receptores como RXR-PPAR $\gamma$  (MU et al., 2001; SAITOH et al., 2001). Recentemente, o TBT ativou os ER- $\alpha$  e ER- $\beta$  em dose dependente de células adiposas do rim, epidídimo e tecido adiposo marrom (PENZA, 2011), e sendo agonista do ER- $\alpha$  em células de adenocarcinoma MCF-7 (SHRUTI, 2013).

Apesar de existir investigações demonstrando os efeitos tóxicos dos organoestênicos em diferentes modelos de estudo direcionando a influência adipogênica, mas pouco se sabe sobre a atividade desse xenobiótico em alterações metabólicas tecidos-específicas, influenciadas por modificações nos hormônios sexuais, em especial o estrogênio, induzidas pela exposição ao TBT.

## **2- OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo geral**

Investigar as possíveis alterações morfofisiológicas em ratas com ciclo reprodutivo regular, submetidas a exposição crônica com tributilestanho.

### **2.2 Objetivos específicos**

- Identificar os efeitos da exposição do tributilestanho no peso corporal e no peso dos principais tecidos adiposos dos animais;
- Identificar os efeitos da exposição do tributilestanho nos níveis séricos dos esteroides ovarianos e enzimas hepáticas;
- Identificar os efeitos da exposição do tributilestanho na histologia tecido adiposo branco e do fígado;
- Identificar os efeitos da exposição do tributilestanho na expressão da proteína do receptor ER- $\alpha$  presente no tecido adiposo branco;
- Identificar os efeitos da exposição do tributilestanho na expressão da proteína de macrófagos ED1 hepáticos;
- Identificar os efeitos da exposição do tributilestanho na deposição lipídica em células 3T3L1.

### 3- METODOLOGIA

#### 3.1 Grupos experimentais

Foram utilizadas ratas Wistar férteis (*Rattus norvegicus*) pesando entre 200 e 230 g, com 12 semanas de idade, mantidas em gaiolas de polipropileno (43 cm x 30 cm x 15 cm). As condições de temperatura e umidade do ambiente foram controladas, o ciclo de 12 horas de claro / escuro foi mantido, e as ratas tiveram livre acesso à água e comida durante todo o experimento. Todas as ratas apresentaram ciclo estral regular de 4 a 5 dias, sendo que o ciclo reprodutivo foi monitorado por análise do esfregaço de secreção vaginal recolhida diariamente durante pelo menos 2 semanas consecutivas antes de iniciar os experimentos (Lisboa et al., 2001; Podratz et al., 2012).

Os animais foram divididos em dois grupos: (1) TBT (n=10), grupo tratado diariamente com tributilestanho, na dose de 100 ng/kg de peso corporal/dia de tratamento. O TBTCI (Sigma, St. Louis, MO) foi diluído na solução veículo (solução de etanol 0,4%). O tratamento durou 15 dias, e foi realizado por via oral. (2) Controle (CON, n=10), grupo que recebeu solução veículo seguindo o mesmo protocolo aplicado ao grupo TBT. Todos os experimentos foram realizados com de acordo com as orientações do *Biomedical Research Guidelines for the Care and Use of Laboratory Animals* (disponível on-line em [http://www.cfmv.org.br/portal/legislacao/resolucoes/resolucao\\_879](http://www.cfmv.org.br/portal/legislacao/resolucoes/resolucao_879)), seguindo as recomendações do *American Veterinary Medical Association Guidelines*, 2007 (disponível on-line em <http://www.nih.gov>). E ainda, todos os procedimentos foram aprovados, previamente, pelo Comitê de Experimentação Animal da Universidade do Estado do Espírito Santo (CEUA número 047/10).

### **3.2 Eutanásia e Dosagem Hormonal**

Durante a manhã do primeiro estro apresentado por cada rata, após os 15 dias de tratamento, cada animal foi anestesiado com ketamina (dose de 30 mg / kg de peso corporal, via injeção intramuscular) e xilazina (dose de 3 mg / kg de peso corporal, via intramuscular). Em seguida, cada fêmea foi heparinizada (dose de 100 U / kg de peso corporal, via injeção peritoneal) e eutanaziada 15 minutos após a injeção de heparina.

Após decapitação, as amostras de sangue foram recolhidas e imediatamente centrifugadas a 825 G, a 4 °C durante 10 minutos para se obter plasma, que foi acondicionado a -20 °C para medições futuras dos níveis de estradiol, progesterona, testosterona por radioimunoensaio (Diagnostic Products Corporation, Los Angeles, CA) (Moysés et al. 2001).

### **3.3 Retirada e Pesagem dos Órgãos**

O fígado e o tecido adiposo branco parametrial e retroperitoneal de cada fêmea foram isolados e removidos em fase de estro e em seguida foram pesados, peso úmido, em balança de alta precisão. As correções para possíveis extensões da hipertrofia dos órgãos foram estimadas para cada animal, calculando a razão do peso de órgãos e o peso corporal (UGGERE et al., 2000).



### 3.4 Análise Histológica

Os animais, sob anestesia, foram perfundidos com solução salina estéril contendo heparina (10 U / ml) através do ventrículo cardíaco esquerdo. Em sequência, realizou-se perfusão com formaldeído 10% tamponado com tampão fosfato-salina (PBS-formol). O fígado e os tecidos adiposos parametriaes e retroperitoneais foram removidos, fixados em PBS-formol com pH 7,4, por um período entre 24 e 48 horas à temperatura ambiente. Após a fixação, os tecidos foram desidratados em etanol, clarificados em xilol e banhados em parafina a 60 °C. Posteriormente, os blocos de parafina contendo os tecidos foram cortados em um micrótomo (Leica RM 2125 RTS), gerando cortes de 5 µm de espessura. Os cortes foram corados com hematoxilina e eosina (H&E). Para a análise histológica, foi utilizado um sistema de análise de imagem que consistiu de uma câmara digital (Evolution, Media Cybernetics, Inc., Bethesda, MD) ligada a um microscópio de luz (Eclipse 400, Nikon). Imagens de alta qualidade (2048 × 1536 pixels) foram capturadas com o Pro Plus 4.5.1 (Media Cybernetics).

#### 3.4.1 Morfometria do tecido adiposo branco

Para mensuração morfometria do diâmetro dos adipócitos foram avaliados os grupos controle e tratados com TBT (n=4 por grupo). As gorduras parametrial e retroperitoneal foram analisados 10 campos de cada lâmina dos quais quantificados 10 adipócitos, resultando em um total de 100 adipócitos com duas mensurações de diâmetro. O primeiro e segundo diâmetro fazendo ângulo de 90 graus um para com o outro. O valor é dado a partir das duas medidas  $((D1+D2)/2)$ . As imagens foram capturadas no equipamento que consiste em uma câmara digital (Evolution, Media Cybernetics, Inc., Bethesda, MD) ligada a um microscópio de luz (Eclipse 400,

Nikon). Imagens de alta qualidade (2048 × 1536 pixels) foram capturadas com o Pro Plus 4.5.1 (Media Cybernetics), e posterior análise foram feitas em no programa ImageJ pelo mesmo investigador (LUDGERO-CORREIA A Jr, et al; 2012).

### **3.4.2 Morfometria de tecido hepático**

Para a análise de granuloma os tecidos hepáticos corados com hematoxilina e eosina (H&E) foram analisados e quantificados a área do granuloma mensurando sua proporção com a área do tecido. Contendo assim, uma percentual área granulomatosa por área tecidual (MARON-GUTIERREZ et al., 2011). As imagens foram capturadas no equipamento que consiste em uma câmara digital (Evolution, Media Cybernetics, Inc., Bethesda, MD) ligada a um microscópio de luz (Eclipse 400, Nikon). Imagens de alta qualidade (2048 × 1536 pixels) foram capturadas com o Pro Plus 4.5.1 (Media Cybernetics), e posterior análise foram feitas em no programa ImageJ pelo mesmo investigador.

### **3.5 Extração e Dosagem de Proteínas**

O fígado e os tecidos adiposos brancos retirados durante a eutanásia foram pesados e armazenados a -80 °C para a posterior extração de proteínas totais e realização do *western blotting*. O primeiro passo realizado para a extração foi à homogeneização dos tecidos. Para tanto, foi adicionado em cada amostra um volume de 500 µL de tampão de lise contendo 250 mmol/L de sacarose, 1 mmol/L de EDTA, 20 mmol/L de

imidazol, pH 7.2, e os seguintes inibidores de protease: 1 mmol/L de fluoreto de 4-(2-aminoetil)-benzenosulfonil, 1 mmol/L de benzamida, 10 mg/L de leupeptina, 1 mg/L de pepstatina A, 1 mg/L de aprotinina, e 1 mg/L de quimostatina. As amostras foram homogeneizadas uma a uma a 0°C utilizando um homogeneizador Potter, com 10 incursões por amostra.

As amostras homogeneizadas foram centrifugadas a 10000×g por 20 minutos. O pellet foi descartado e o sobrenadante de cada amostra foi armazenado a -80 °C em tubos eppendorfs para futura quantificação de proteínas totais. Para a determinação da concentração de proteínas totais foi utilizado o método de Lowry (Lowry, et al., 1951). Um volume de 20 µL do sobrenadante de cada amostra homogeneizada foi utilizado para a dosagem, sendo transferidos para tubos de ensaio, com adição de tartarato de cobre, reagente de folin (Sigma) e água. Este método se baseia na reação do cobre com a proteína presente em cada amostra, em meio alcalino, e posterior redução do reagente de folin. Quando ocorre a redução do reagente de folin, o resultado é uma cor mais intensa com absorção máxima em 550 nm, logo, quanto mais proteína, mais intensa é a coloração nos tubos.

A concentração de proteínas foram determinada através de uma curva padrão previamente construída com diferentes concentrações de solução de albumina soro bovina (BSA, Sigma-Aldrich) e o “branco” utilizado, que foi o tampão de lise das proteínas teciduais.

### **3.6 Cultura de células e diferenciação**

Para o estudo *in vitro* foi utilizada a linhagem celular 3T3-L1. Essas células foram adquiridas do Banco de Células da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ) e foram cultivadas em meio Dulbecco's Modificado (DMEM) (Gibco®) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) (Gibco®), 1% antibiótico/antimicótico (Sigma®), sob uma atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub> a uma temperatura de 37°C. As células foram

mantidas em cultura nessas condições até atingirem a confluência de aproximadamente 100% e em seguida foram transferidas para placas de seis poços, para realização dos experimentos. Após atingirem 100% de confluência nos poços, as células foram submetidas ao processo de diferenciação, permanecendo três dias em meio DMEM, contendo 10% de SFB, 100 mM de 1-metil-3-isobutilxantina (IBMX) (Sigma®), 1mM de dexametasona (Sigma®) e 5mg/L de insulina (Sigma®). Após esse período, as células ficaram sete dias em meio DMEM contendo, 10% de SFB e 5 mg/ml de insulina. Após o período de diferenciação celular os adipócitos foram submetidos à depleção dos hormônios por 24h com meio DMEM suplementado com soro fetal Charcoal Stripped (Sigma®). Após a depleção, as células foram submetidas aos tratamentos com estrogênio, TBT e antiestrogênio ICI 182780, um inibidor da ação do estrogênio que se liga ao receptor RE- $\alpha$  (Dauvois,1993). Tratamentos foram nas seguintes combinações TBT10 nM, TBT 100 nM, E<sub>2</sub> na concentração de 10<sup>-7</sup>M, TBT+E2, ICI (antiestrogênio 182780), ICI+E2 e ICI+TBT, durante 24h. O grupo não tratado foi usado como controle (C).

### **3.7 Coloração com *Oil red* das células 3T3-L1 e e tecido hepático**

#### **3.7.1 Coloração Cultura**

Após 10 dias de diferenciação foi retirado o meio de cultura das células e foram lavadas duas vezes com PBS. Posteriormente, acrescentou-se 1ml de paraformaldeído à 4% e deixado por 30 minutos a temperatura ambiente, após esse tempo lavou-se as células três vezes com PBS. Em seguida colocou-se 300µl de corante *Oil Red O* (Sigma®), incubou-se por 2 horas a 37°C. Após esse período foram lavadas três vezes com água destilada e colocadas na estufa para secar. As células foram observadas no microscópio invertido para constatarmos a

diferenciação pela coloração em vermelho das células adiposas. Este passo do experimento foi feito na Universidade do estado de São Paulo Departamento de Clínica Médica, UNESP – Botucatu, SP pela orientação da Professora Dr. Celia Nogueira.

### **3.7.2 Coloração tecido hepático**

Após fixação do tecido hepático em PBS-formaldeído, Os cortes histológicos de tecido hepático foram corados com Oil-Red-(Sigma, USA) com o objetivo de localização de lipídeos neutros. Os cortes foram incubados com o corante durante 15 minutos e, decorrido este tempo, lavados em água corrente por 10 minutos, e colocado uma lamínula. As imagens foram capturadas no equipamento que consiste em uma câmara digital (Evolution, Media Cybernetics, Inc., Bethesda, MD) ligada a um microscópio de luz (Eclipse 400, Nikon). Imagens de alta qualidade (2048 × 1536 pixels) foram capturadas com o Pro Plus 4.5.1 (Media Cybernetics), e posterior análise foram feitas em no programa ImageJ.

### **3.8 Western Blotting (*Immunoblotting*)**

Após as dosagens das proteínas totais, retiramos o volume necessário de cada amostra tanto de tecido adiposo branco quanto de fígado para uma concentração de 100 µg/µL. Para a preparação de cada amostra, foi adicionado o tampão de amostra contendo Tris–HCl 62.5 mM, pH 6.8, 2% de dodecil sulfato de sódio (SDS), 5% de glicerol, 0.01% de bromofenol azul, e 1.7% de β-mercaptoetanol. As proteínas

presentes em cada eppendorf foram solubilizadas, a água a 100 °C por 5 minutos. Conforme Celis (2006), o gel SDS-PAGE (do inglês, *polyacrylamide gel electrophoresis*) foi preparado usando 10% de SDS e 30% poliacrilamida (acrilamida e bisacrilamida). As amostras foram pipetadas e alocadas em cada um dos poços ("lane") dos géis e as corridas de eletroforese tiveram duração de 1 hora e 30 minutos a 120 Volts. Durante a eletroforese, as amostras e os géis se mantiveram imersos em tampão de corrida. Em seguida, em uma cuba com tampão de transferência, as proteínas foram transferidas do gel para uma membrana de nitrocelulose (Bio-Rad, Hercules, CA). Tanto o gel que continha amostras de fígado quando o de tecido adiposo branco, após a transferência as membranas foram lavadas com tampão tris-salina 0.05% e tween 20 (TBS-T), e bloqueadas com BSA 5% em solução de TBS-T por 1 hora a 4 °C. Em seguida, as membranas foram novamente lavadas com TBS-T por 10 minutos e incubadas com seus respectivos anticorpos primários, isto é para tecido adiposo branco IgG anti receptor de estrogênio alfa (ER-  $\alpha$ ) e para tecido hepático IgG anti glicoproteína (ED-1). As diluições foram, para o anticorpo policlonal de ER-  $\alpha$  (ER- $\alpha$ , diluição 1:500, em 3% BSA em TBS-T, durante toda a noite a 4 °C) (Santa Cruz Biotechnology, INC), e para anticorpo monoclonal de antígeno glicoprotéico presente na superfície lisossomal de granulócitos, ED-1 (ED-1, diluição 1:500, em 3% BSA em TBS-T, durante toda a noite a 4 °C, Abd serotec). Para a avaliação da expressão da proteína destes genes foi utilizado anticorpo policlonal anti-região C-terminal da  $\beta$ -actina, sendo a  $\beta$ -actina utilizada como controle interno de cada western blotting realizado ( $\beta$ -actina, diluição 1:1000, em 3 % BSA em TBS-T, durante toda a noite a 4 °C) (Santa Cruz Biotechnology, INC).

Após a incubação com os anticorpos primários, as membranas foram lavadas 3 vezes por 10 minutos cada com TBS-T e em seguida, a membrana foi incubada com anticorpo secundário anti-IgG de rato conjugado com fosfatase alcalina (Sigma). Para a incubação do anticorpo secundário, utilizou-se para anticorpo anti ER- $\alpha$  (1:1000, em 3 % BSA em TBS-T, por 1 hora a 4 °C) (Sigma Immuno-Chemicals), ED1 (1:500, em 3 % BSA em TBS-T, por 1 hora a 4 °C) e para o anticorpo anti  $\beta$ -actina (1:4000 em 3 % BSA em TBS-T, por 1 hora a 4 °C).

O resultado de cada western blotting foi visualizado pela adição de 200  $\mu$ L de solução estoque dos reveladores NBT (do inglês, *nitroblue tetrazolium chloride*) e

BCIP (do inglês, *5-bromo-4-chloro-3-indolylphosphate p-toluidine salt*, 50 mg/mL) (Life Technologies, Rockville, MD) em 10 mL de solução de tris-HCl e NaCl 0,1 M, pH 9,5, onde as membranas ficaram imersas por 5 minutos, sob agitação em temperatura ambiente. Tais reveladores são utilizados para a detecção colorimétrica da atividade da fosfatase alcalina. As bandas de ER- $\alpha$ , ED-1 e  $\beta$ -actina foram analisadas por densitometria, através de unidades densitométricas arbitrárias, utilizando o Programa Image J. A expressão relativa da proteína de ER- $\alpha$  e de ED-1 foram divididos pelos valores correspondentes de  $\beta$ -actina.

### 3.9 Análises estatísticas

Os dados foram apresentados como média  $\pm$  EPM. As comparações entre os grupos foram analisados pelo teste t Student (não pareado e/ou não pareado). O teste de normalidade Kolmogorov-Smirnov. Teste de Dunnett (in vitro), ANOVA 2 vias, seguido do teste de Tukey (pesos). A significância estatística foi considerada quando  $p < 0,05$ .

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Peso corporal diário, dosagem Hormonal

Após o tratamento com TBT, as ratas apresentaram um aumento de peso corporal no final do 15º dia. Antes do tratamento, os animais apresentaram as seguintes pesagens CON ( $226,7 \pm 5,3$ ) e TBT ( $225,3 \pm 3,6$ ) não apresentaram diferença

significativa, já ao final do tratamento com termino de 15 dias os animais tratados com TBT apresentaram um aumento significativo para CON ( $236,2 \pm 6,4$ ) e TBT ( $260,5 \pm 5,1$ ) para  $p < 0,5$ .

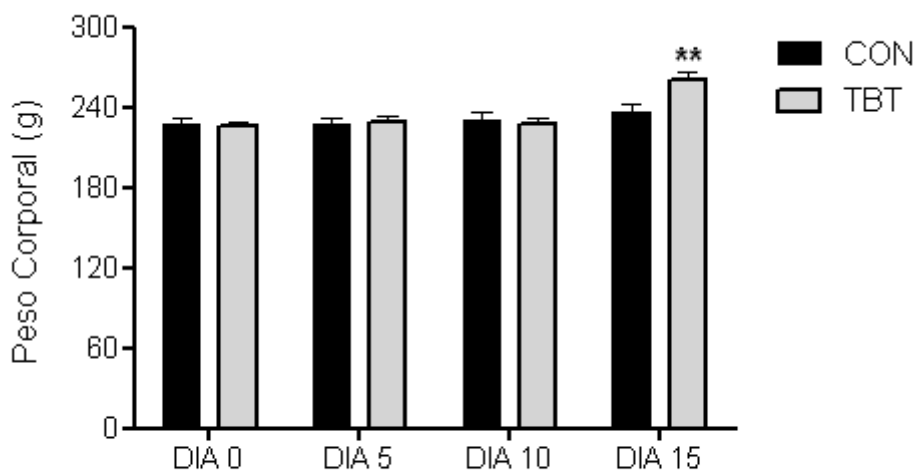


Figura 1 – Peso corporal diário de animais controle e expostos ao TBT por 15 dias.  $p < 0.05$  vs grupo controle. (ANOVA 2 vias, seguido do teste de Tukey).

Os triorganoestânicos, como TBT e o TPT, mesmo quando administrado em doses menores do que a estipulada pela Agência de Proteção Ambiental Americana (USEPA; 0.3 mg/ kg) (USEPA, 1997), apresentam ação de desregulação endócrina, (CASALS-CASAS; DESVERGNE, 2011), que estão relacionadas com efeitos metabólicos de ganho de peso e aumento de tecido adiposo, caracterizando um efeito obesogênico (Grun et al., 2006). Essa desregulação endócrina relaciona-se com a redução nas concentrações séricas de estrogênio, devido a ação antiestrogênica do TBT, proporcionando um aumento na deposição no tecido adiposo (Carfi et al., 2008), essa ação também foi vista em estimular a proliferação e a diferenciação de adipócitos *in vitro* (Feige et al., 2007; Masuno et al., 2003, 2005; Grun et al., 2006). Essa característica antiestrogênica do TBT pode ter sido uma das responsáveis pelo aumento do peso dos ratos no final de 15 dias. Zuo et al em 2009 afirmou em um trabalho que animais tratados com TBT teriam aumento de peso em 45 dias, caracterizando um processo de obesogênese. Contudo, tais dados corroboram com dados visto na Figura 1.



Tabela 1 - Concentração de hormônios sexuais femininos, perfil lipídico e enzimas hepáticas.

Grupos	LDL (mg/dL)	HDL (mg/dL)	TGO (U/L)	TGP (U/L)	E <sub>2</sub> (pg/mL)	P <sub>4</sub> (ng/mL)	Test (ng/dL)
CON	22.7±2.0	13.7±0.2	203.5±3.6	41.0±1.1	47.2 ± 7.0	4.0 ± 0.7	4.8 ± 0.8
TBT	24.8±3.8	12.1±0.7	217.8±3.5	46.5±2.0	32.2 ± 4.3*	7.0 ± 1.2*	4.3 ± 0.2

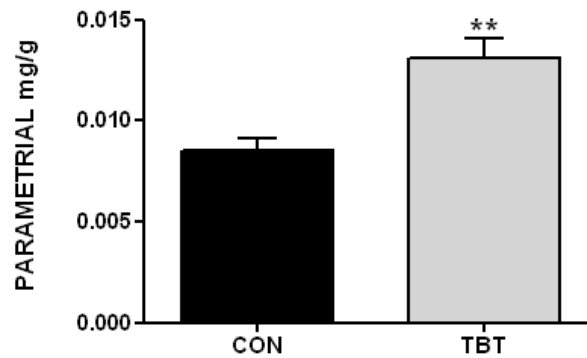
Valores de Lipoproteína de baixa densidade (LDL), Lipoproteína de alta densidade (HDL), transaminase glutâmico oxalacética (TGO), transaminase glutâmico pirúvica (TGP), Estrogênio (E<sub>2</sub>), Progesterona (P<sub>4</sub>) e testosterona (Test) foram reportados como média ± E.P.M. \*p<0,05 vs controle (CON). Teste t Student (não pareado).

Os níveis séricos de progesterona aumentaram, enquanto os níveis de estrogênio diminuíram após a exposição ao TBT, quando comparado com o controle (Tabela 1). Os valores de testosterona, LDL, HDL, TGO, TGP e o peso dos demais órgãos se mantiveram sem alterações significantes, enquanto outros tecidos tiveram aumento do peso, como o tecido adiposo, já o fígado não teve aumento significativo no peso. Essas alterações de hormônios sexuais podem estar relacionados com alterações disfunções reprodutivas (PODRATZ ET AL., 2012; GRACELI ET AL., 2013), e a influencia em diminuir a atividade da aromatase caracterizando assim a redução do estrogênio (HORIGUCHI, 2006; HEIDRICH, 2001). Contudo, tais desequilíbrios seja através da inibição da aromatase ou da regulação dos fatores de transcrição (SAITOH et al., 2001; NAKANISHI et al., 2002) aumentando desse modo as alterações nos níveis de estrogênio e progesterona, após exposição do TBT podem ser justificadas.

## 4.2 Pesos úmidos de tecidos adiposos

Após a dissecação, encontramos aumentos apenas nos tecidos adiposos parametriaes e retroperitoneais comparados com o controle (Figura 2).

**A**



**B**

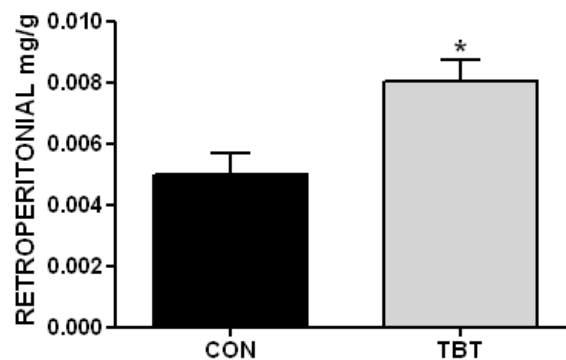


Figura 2: Efeito do tratamento com TBT sobre: Tecido adiposo parametrial (A) e retroperitoneal (B) \* $p < 0,5$  e \*\* $p < 0,001$  vs grupo CON..Teste t Student (não pareado).

Pode-se ver um aumento nas duas gorduras parametrial CON vs TBT e retroperitoneal CON vs TBT, esse aumento no tecido adiposo apresentam concordância com trabalhos de modelos animais. Onde após tratados com organoestânicos apresentaram adipogênese, como e o caso do trabalho onde exposição a organoestânicos podem induzir adipogênese, demonstrando um efeito via sua interação com PPAR $\gamma$  / RXRa (GRÜN; BLUMBERG, 2006; Grün et al., 2006), esse efeito promove a diferenciação de células multipotentes do estroma a se diferenciar em adipócitos (KIRCHNER et al., 2010) um efeito que poderia levar o aumento de massa com o tempo de exposição. Outras pesquisas demonstraram a capacidade adipogênica tanto *in vitro* como *in vivo* do TBT (KANAYAMA et al, 2005;

INADERA et al 2005). Tal ganho de peso devido o aumento na adipogênese pode ser visto *in útero* quando animais expostos a TBT apresentaram em suas proles, aumentaram significativamente o acúmulo de lipídio em fígado e testículo (GRUN et al, 2006), modificando seu processo de programação fetal.

#### 4.3 Morfometria dos tecidos adiposos (*in vivo*)

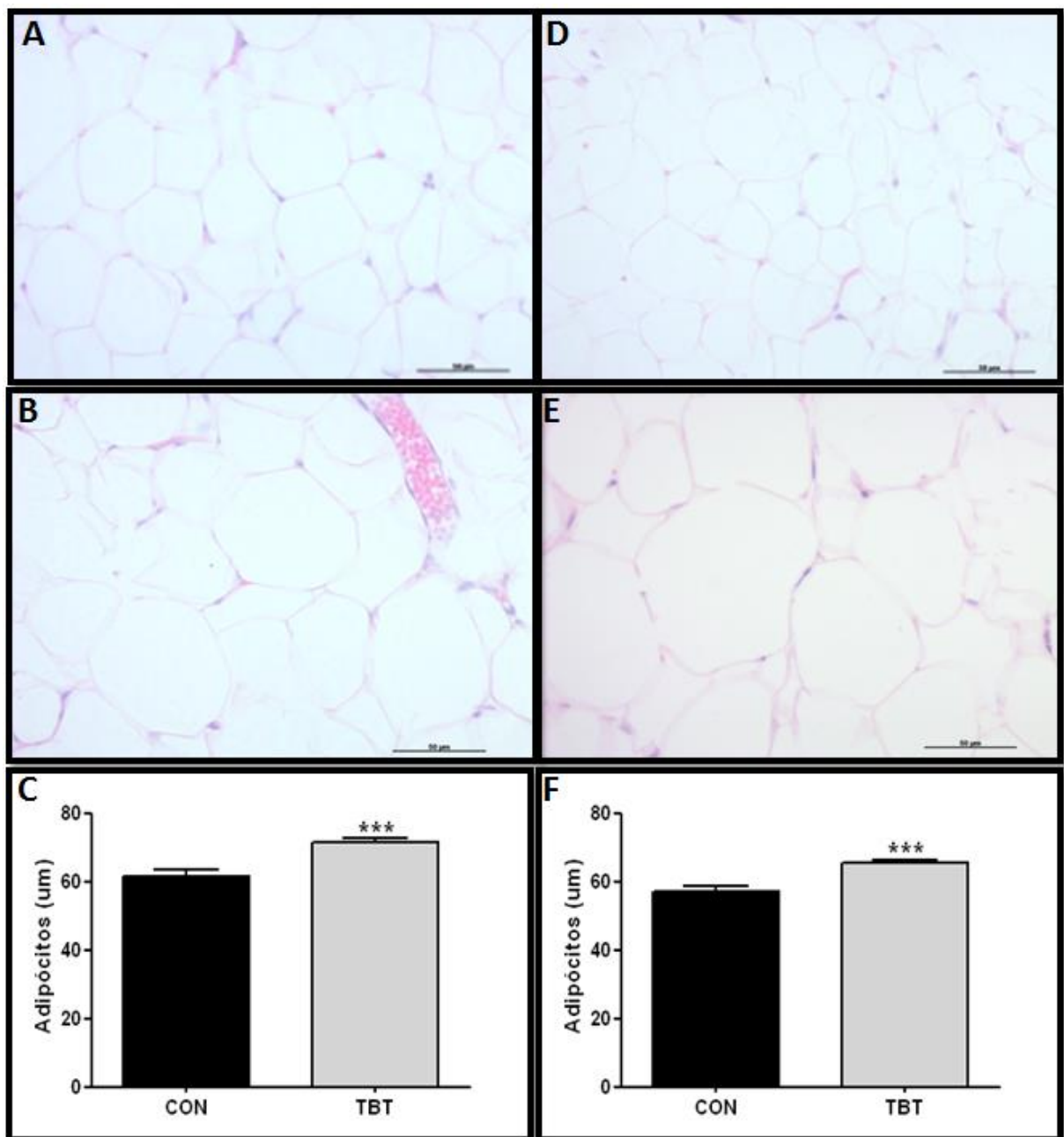


Figura 3 – Diâmetro médio dos adipócitos de animais controle e expostos a TBT por 15 dias. Imagens A e B são fotos do tecido retroperitoneal aumento 20x e 40x respectivamente, D e E e do tecido

parametrial aumento de 20x e 40x respectivamente, C e F representa em gráfico o aumento do diâmetro, retroperitonal e parametrial, respectivamente. \*\*\* $p < 0,0001$ . Teste t Student (não pareado).

Após exposição ao TBT, os tecidos adiposos bancos parametriaux e retroperitonias apresentaram aumento de peso úmido/peso corporal. Um aumento de diâmetro médio de 14,5% (TBT:  $65.33 \pm 0.92$  vs CON:  $56.88 \pm 1.70 \mu\text{m}$ ,  $p < 0,001$ ) e de 15,7% (TBT:  $71.30 \pm 1.43$  vs CON:  $61.61 \pm 1.76 \mu\text{m}$ ,  $p < 0,001$ ) quando comparados aos seus respectivos tecidos adiposos controle, respectivamente. Penza et al., (2011) demonstrou que o tratamento com TBT ocasionou alterações morfofuncionais no tecido adiposo epididimal de ratos. Outros trabalhos demonstraram adipogênese *in vivo* e *in vitro* (GRUN;BLUMBERG, 2006) mostrando o efeito sobre tecido adiposo causado por orgnoestânicos.

#### 4.4 Western Blotting (Immunoblotting)

A exposição do TBT aumentou em 31% e 46 % a expressão da proteína do receptor de estrogênio alfa comparado com animais controles nas gorduras parametriaux e retroperitonias (Figura 4). A conversão de androgênios em estrógenos é catalisada pela atividade da aromatase em áreas específicas do cérebro, das gônadas, do tecido adiposo branco, e em vários outros tecidos (Grote et al., 2006).

Em mamíferos, como ratos (Grote et al., 2006), e modelos de estudos *in vitro* que constatarem a inibição da atividade da aromatase humana (Cooke et al., 2002; Heidrich et al., 2001) após a exposição aos organoestânicos. Baseado em estudos bioquímicos, os compostos organoestânicos podem ser agonistas para receptores nucleares, como o receptor retinóide X (RXR) e receptores PPAR $\gamma$  (Grün; Blumberg, 2006).

Dessa maneira os organoestânicos aumentam a capacidade de adipogênese através da interação com receptores PPAR/RXR- $\alpha$  fetal, promovendo um tipo de estresse químico com capacidade de desenvolver a obesidade. (Grün e Blumberg, 2006;Grün et al., 2006). Alguns estudos demonstram que o TBT pode atuar como ativador direto do receptor de estrogênio em tecido adiposo de mamíferos, aumentando a expressão ER- $\alpha$  em tecidos específicos, como tecido adiposo branco, marrom e pâncreas, mas não no tecido hepático e testicular (Penza et al.,2011).

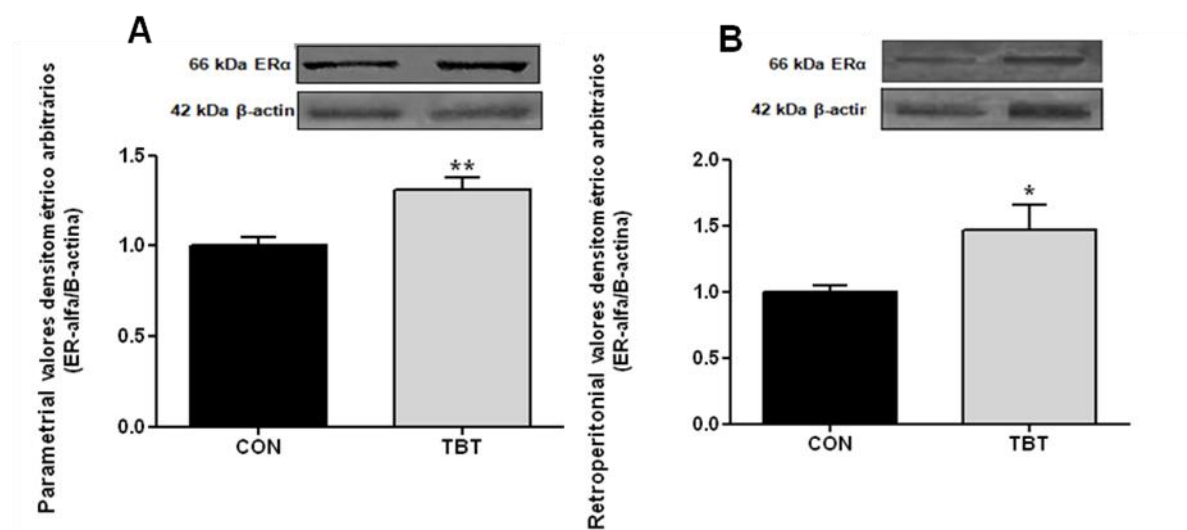


Figura 4 – Expressão proteica do receptor ER- $\alpha$  no tecido adiposo (A) parametrial e (B) retroperitoneal de animais controle e tratados com TBT (\* $p < 0.05$ ) vs grupo CON. Teste t Student (não pareado).

Outras investigações, demonstram que a ativação de ERs ocorre em doses 50 a 5000  $\mu\text{g} / \text{kg}$ , em tecidos específicos e dose-dependente para ER (TAKAHASHI et al, 1999;. RANTAKOKKO et al, 2008;. KANNAN et al.,1999). Nossos resultados demonstraram aumento significativo na expressão do ER- $\alpha$  em 31% e 46% na gordura parametrial e retroperitoneal respectivamente, nas doses de 100ng/kg.

#### 4.5 Efeitos do TBT *in vitro*

Após tratamento de 24h em células 3T3-L1, encontramos aumento na deposição de gotículas lipídicas (*Oil-Red O*). Células 3T3-L1 tratadas com TBT 10 nm apresentaram aumento no acúmulo de lipídio 22%, concordando com resultados obtidos em trabalhos que avaliaram efeito ativador do TBT em processo de adipogênese in vivo (PENZA et al., 2011) e adipogênese em células de pré-adipócitos 3T3-L1 (KIRCHER et al., 2010). Outras substâncias químicas, como o bisfenol A (BPA) foi caracterizada por aumentar o transporte de glicose acelerando assim a conversão de 3T3-L1(fibroblasto) em adipócitos (MASUNO et al., 2002; SAKURAI et al.,2004).

Desta forma, quando realizamos o tratamento das células com estrogênio houve uma redução significativa ( $P<0,05$ ) no depósito de lipídio comparado com controle, caracterizando um efeito anti-adipogenico do estrogênio, O tratamento que utilizava o estrogênio + TBT demonstrou uma redução significativa ( $P<0,001$ ) do acúmulo de lipídio nas células, demonstrando que o efeito do estrogênio sobre as células apresentaram superior ao efeito adipogênico do TBT.

O inibidor de estrogênio ICI não apresentou diferença significativa com controle como esperado, mas quando acompanhado de estrogênio (ICI+E2) e TBT (ICI+TBT) apresentaram redução significativas para ( $p<0,0001$ ), dando assim a credibilidade do efeito no o acúmulo de lipídio a relação do TBT sobre o receptores de estrogênio demonstrado em trabalhos como Penza et al (2011) onde foi possível ver aumento da expressão de ERs após técnica de biologia molecular onde animal foi trasfectado com genes codificadores do receptor ligado a um gene repórter, e em outro experimento onde células 3T3-1 que não apresentaram ER foram trasfectadas com genes que codificam o receptor, dessa maneira o TBT estimulou a a diferenciação de pré adipócito em adipócitos.

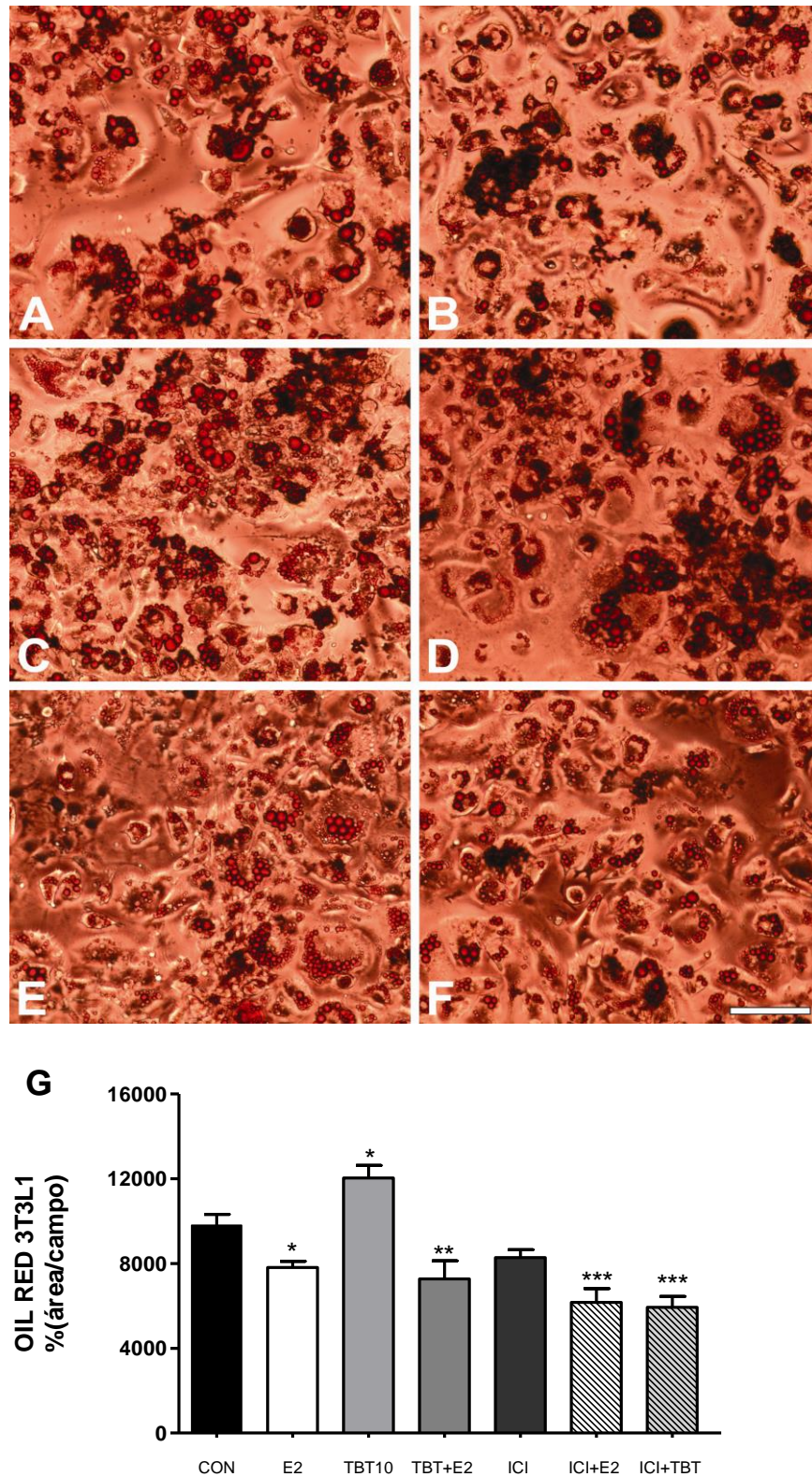


Figura 5– Deposição de gotículas de lipídios nas células 3T3L1 (A) controle, (B) estrogênio (10-7M), (C) TBT 10nM, (D) TBT mais estrogênio, (E) ICI mais estrogênio, (F) ICI mais TBT. (G) Representação da quantificação da deposição de gotículas lipídicas após coloração de oil red (% de área colorada/ área do campo). Dados expressos como média  $\pm$ EPM. (n=4).  $p < 0.05$  vs grupo controle (ANOVA uma via, seguida pelo Teste de Dunn's). Barra: 100 micrometros.



## 4.6 Parâmetros hepáticos

### 4.6.1 Análise histológica

Os resultados já mencionados de TGO e TGP, já demonstraram que havia alguma alteração na função hepática destes animais induzida pelo TBT. Contudo, a exposição ao TBT ocasionou modificações morfológicas, como o início da deposição de gotículas lipídicas (Figura C e D), e formação de processo inflamatório no tecido hepático (Figure E e F) Ademais, encontramos um aumento da fração de granuloma no grupo exposto ao TBT de 280%. vs controle. (TBT:  $0.028 \pm 0.006$  vs CON:  $0.01 \pm 0.003$ ,  $\mu\text{m}^2$   $p < 0.01$ ).

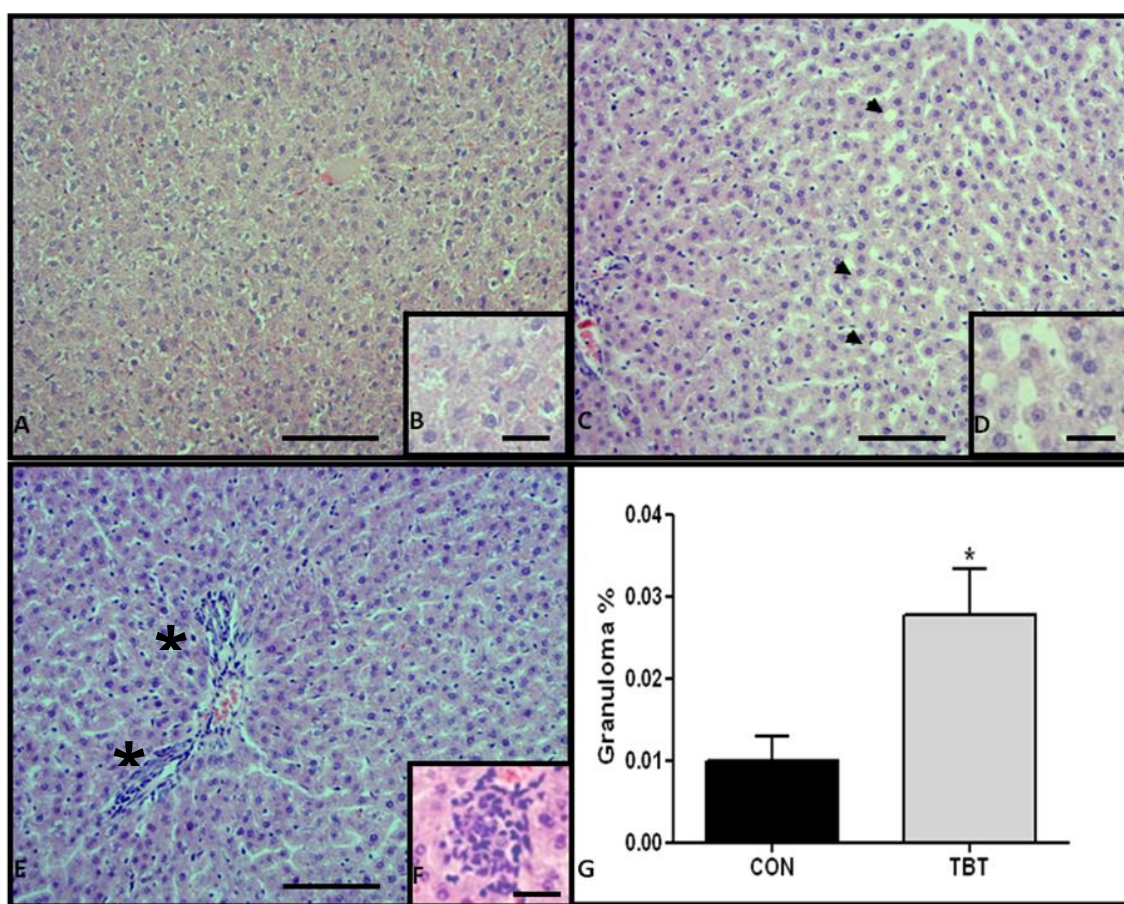


Figura 6 – Histologia do tecido hepático de animais controle e tratados com TBT: Controle (A) e (B) tecido hepático com aspecto normal. E (C) e (D) caracterizando acúmulo gotas lipídicas no citoplasma de hepatócitos. (E) e (F) tecido hepático com processo inflamatório (asterisco) após exposição ao TBT (100ng/kg, 15 dias). (G) Quantificação da % área de granuloma do tecido hepático (com granuloma por área de tecido. (\* $p < 0.05$ ) vs grupo CON.



Apesar de não encontrarmos modificações significantes no perfil lipídico destes animais, encontramos alterações morfológicas importantes que sugerem prejuízo hepático. Apesar disso sabe-se que o TBT é metabolizado no fígado pela enzima aromatase, sendo assim convertido em DBT (OHHIRA et al, 2003; UENO et al 2003). Um dos prejuízos como demonstrado acima caracteriza um processo inflamatório. Krajnc et al (1984) afirmou que o metabolito DBT oriundo do TBT, no fígado causou processo inflamatório no ducto biliar associado com lesões hepáticas. Gummy et al (2008) direcionou o a influência do DBT na resposta imune, ao fato desse xenobiótico interferir na modulação de glicocorticóides no sistema imune podendo contribuir para processos inflamatórios. O DBT tem um grande efeito na fisiologia hepática, uma delas é a inibição alostérica do GR (receptor de glicocorticóide) diminuindo assim a produção de citocina pré inflamatórias produzida por macrófagos (GUMMY et al 2008).

#### **4.6.2 Western Blotting marcador de macrófago ativado (ED1)**

Para corroboração com nossa análise histológica, encontramos um aumento na expressão da proteína de macrófagos ED1 em 67% ( $p < 0.01$ ), após exposição ao TBT, pela técnica de western blotting.

O aumento na expressão proteica do ED-1 (antígeno de glicoproteína expresso em membrana lisossomal de mieloides) reporta uma maior produção de células inflamatórias, dessa maneira animais tratados com TBT apresentam processos inflamatórios hepáticos como relatado por Krajnc et al (1984).

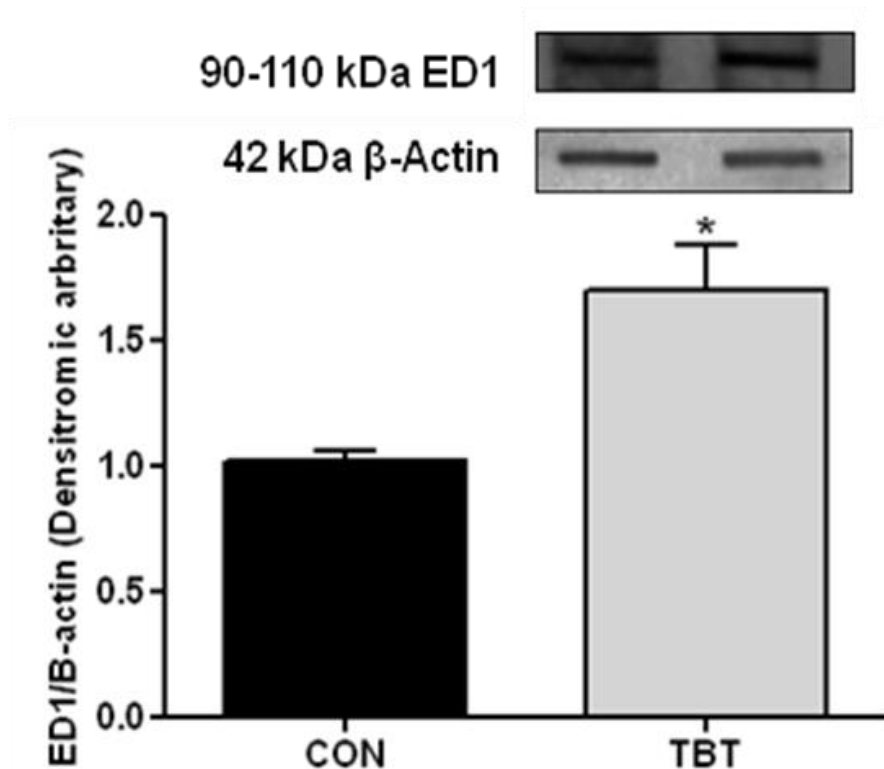


Figura 7- Expressão da proteína ED1 de macrófagos no tecido hepático de animais controle e tratados com TBT. Dados expressos como média  $\pm$  EPM. (n=4). \* $p < 0.05$  vs grupo controle

#### 4.6.3 Coloração de *Oil red* hepática

Como sugerido pela análise histológica, há um aumento na deposição de gotículas lipídicas no grupo TBT, demonstrado pela fração de área (após a coloração de *Oil Red* (CON:  $0.0006 \pm 0.00007$  vs TBT:  $0.0014 \pm 0.00009$   $\mu\text{m}^2$ ). Esse resultado do aumento no acúmulo de lipídio no fígado, está de acordo com dados de tratamento agudo de 45 dias feito por Zuo et al. (2009) onde afirma que a redução do nível de adiponectina hepáticas teve redução dose dependente quando animal foi exposto a tratamento crônico com baixas doses de TBT, e por consequência das baixas doses animais tiveram aumento no quadro de esteatose hepática. No trabalho de

Chamorro-García et al (2013) demonstrou que o TBT produziu efeito através gerações sobre depósito de gordura no fígado, pelo menos ate a geração F3.

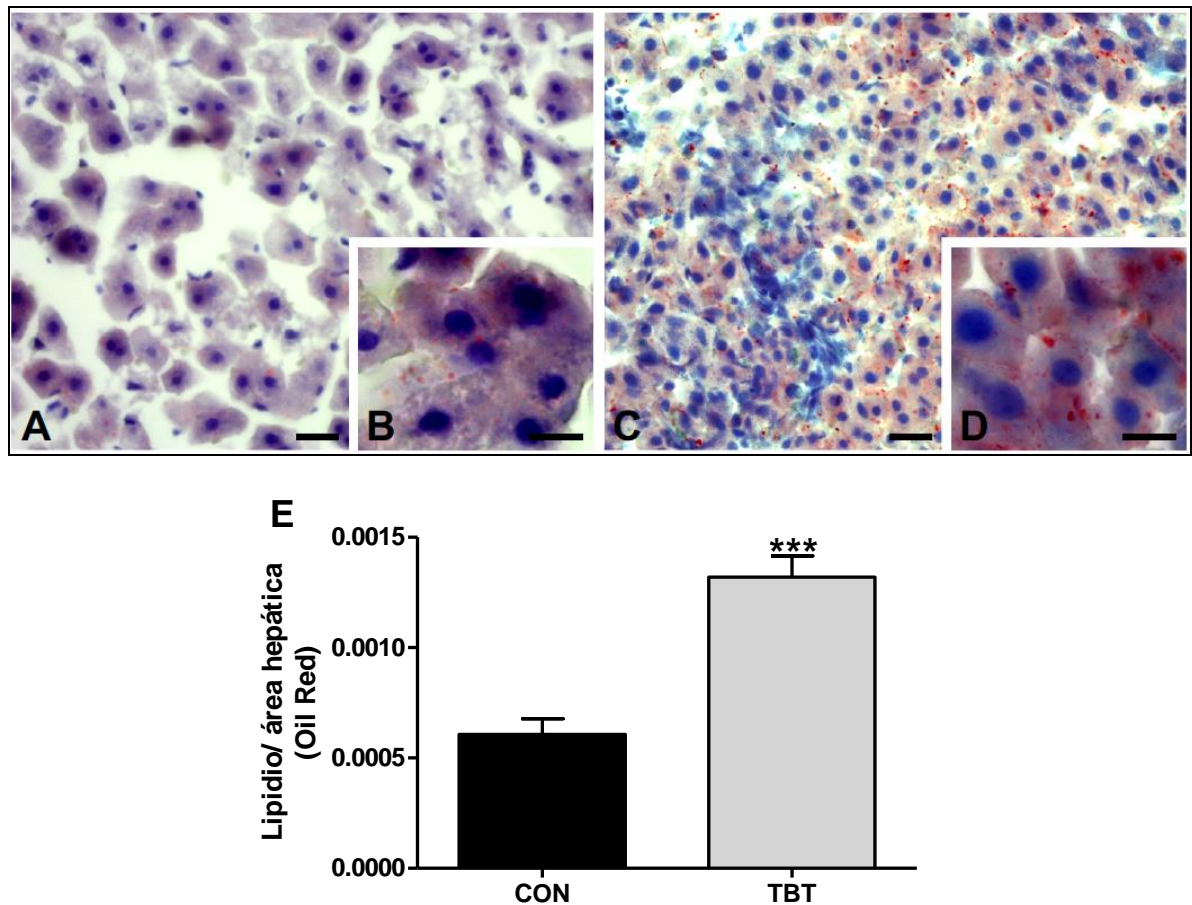


FIGURA 8: Tecido hepático corado com a coloração de *Oil Red*. (A) e (B) controle, deposição lipídica normal depósito de lipídio. (C) e (D) Aumento da deposição de gotículas de lipídios, (E) Representação da quantificação da deposição de gotículas lipídicas após coloração de oil red % de área corada/ área do campo). \* \* \*  $p < 0,0001$  vs grupo controle.

## 5 CONCLUSÕES

As evidências encontradas neste trabalho indicam que a exposição a baixas doses de TBT alterou a distribuição e morfometria do tecido adiposo branco, parametrial e retroperitoneal. Houve um aumento do diâmetro médio dos adipócitos, possivelmente por aumento da expressão da proteína do RE-alfa. *In vitro*, a deposição de gotículas de lipídicos em células 3T3L1 foi atenuada tratamento com TBT com inibidor dos receptores de estrogênio. Outra alteração metabólica importante foi encontrada no tecido hepático com aumento na deposição lipídica, na fração de granuloma e na expressão da proteína ED1. Estes dados sugerem que o TBT pode estimular um aumento na deposição/ distribuição do tecido adiposo branco (tecido parametrial e retroperitoneal) de forma específica *in vivo*, via o RE- $\alpha$ , e, alterar a função metabólica hepática, contribuindo para modificação na função metabólica, que poderia contribuir para o desenvolvimento para a obesidade, tornando-se a sua exposição um fator de risco metabólico.

## 6. REFERÊNCIAS

AGENDA 21. **Seção 17.22**. Rio de Janeiro. 1992. Disponível em: <[http://www.mp.sp.gov.br/portal/page/portal/cao\\_urbanismo\\_e\\_meio\\_ambiente/legislacao/leg\\_federal/leg\\_fed\\_agenda21\\_rio92/17%20Oceanos.htm](http://www.mp.sp.gov.br/portal/page/portal/cao_urbanismo_e_meio_ambiente/legislacao/leg_federal/leg_fed_agenda21_rio92/17%20Oceanos.htm)>. Acesso em: 29 de novembro de 2012.

ALZIEU, C. Tributyltin case study of a chronic contaminant in the coastal environment. **Ocean & Coastal Management**, v. 40, p. 23–36, 1998.

BADMAN, M. K.; FLIER, J. S. The gut and energy balance: visceral allies in the obesity wars. **Science**, 307, 1909–1914. 2005

BENNET, R. F. Industrial manufacture and applications of tributyltin compounds. De Mora, S. J. (Ed). In: **Tributyltin: a case study of an Environmental Contaminant**. Cambridge: Cambridge Environmental Chemistry Series. Cambridge Univ. Press., p.21-61, 1996.

BERTRAM, C. E.; HANSON, M. A. Animal models and programming of the metabolic syndrome. **British Medical Bulletin**, 60:103–121. 2001

BROWN, R. P.; GREER, R. D.; MIHAICH, E. M.; GUINEY, P. D. A critical review of the scientific literature on potential endocrine-mediated effects in fish and wildlife. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 49, p. 17-25. 2001.

BILA, D. M.; DEZOTTI, M. Desreguladores endócrinos no meio ambiente: efeitos e consequências. **Química Nova**, v. 30, n. 3, 2007.

BLUNDEN, S. J.; EVANS, C. J. Organotin compounds In: Hutzinger, O (Ed) **The Handbook of Environmental Chemistry**. Berlim:Springer-Verlog, v.3, p.1-44, 1990.

CASALS-CASAS, C.; DESVERGNE, B. Endocrine disruptors: from endocrine to metabolic disruption. **Annual Review of Physiology**, v. 73, p. 135–162. 2011.

CASALS-CASAS, C.; FEIGE, J. N.; DESVERGNE, B. Interference of pollutants with PPARs: endocrine disruption meets metabolism. **International Journal of Obesity** (Lond) Suppl 6: S53–S6. 2008.

CARFI, M.; CROERA, C.; FERRARIO, D.; CAMPI, V.; BOWE, G.; PIETERS, R.; GRIBALDO, L. TBTC induces adipocyte differentiation in human bone marrow long term culture. **Toxicology**, 249 (1), 11–18. 2008.

CHAMORRO-GARCÍA, R.; SAHU, M.; ABBEY, R. J.; LAUDE, J.; PHAM, N.; BLUMBERG, B. Transgenerational inheritance of increased fat depot size, stem cell reprogramming, and hepatic steatosis elicited by prenatal exposure to the obesogen tributyltin in mice. **Environmetal Health Perspectives**. 121(3):359-66. 2013.

COSTA, M. B.; OTEGUI, M. B. P.; BARBIERO, D. C.; FERNANDEZ, M. A. S. Occurrence of imposex in *Cymatium parthenopeum parthenopeum* (von Salis, 1793) (Mesogastropoda: Ranellidae) in Vitoria, ES, Brazil. **Journal of the Brazilian Society of Ecotoxicology**, v. 3, p. 65–69, 2008.

COOKE, G. M. Effect of organotins on human aromatase activity in vitro. **Toxicology Letters**, v. 126, p. 121-130, 2002.

COOKE, T. S.; NAAZ, A. Role of estrogens in adipocyte development and function. **Experimental Biology and Medicinal**, 229(11):1127-35. 2004.

COLBORN, T.; VOM SAAL, F. S.; SOTO, A. M. Developmental effects of endocrine-disrupting chemicals in wildlife and humans. **Environmental Health Perspective**, v. 101, p. 378–84, 1993.

DANILOVICH, N.; BABU, P.S.; XING, W.; GERDES, M.; KRISHNAMURTHY, H.; SAIRAM, M. R. Estrogen deficiency, obesity, and skeletal abnormalities in follicle-stimulating hormone receptor knockout (FORKO) female mice. **Endocrinology**, 141 (11), 4295–4308, 2000.

DAUVOIS, S.; WHITE, R.; PARKER, M. G. The antiestrogen ICI 182780 disrupts estrogen receptor nucleocytoplasmic shuttling. **Journal of Cell Science**, 1377-1388. 1993.

DELGADO FILHO, V. S.; MANCINI, C. N.; SILVA, I. V.; PEDROSA, D. F.; DESTEFANI, A. C.; SAMOTO, V. Y.; TAKIYA, C. M.; GRACELI, J. B. Endocrine disruption induced by triorganotin (iv) compounds: Impacts in the reproductive and genetic function. **Journal of Medical Genetics**, v. 2, p. 29–37, 2010.

DELGADO FILHO, V. S.; LOPES, P. F.; PODRATZ, P. L.; GRACELI, J. B. Triorganotin as a compound with potential reproductive toxicity in mammals. **Brazilian Journal of Medical Biology Research**, v. 44, p. 958–965, 2011.

EMA, M.; MIYAWAKI, E. Suppression of uterine decidualization correlated with reduction in serum progesterone levels as a cause of preimplantation embryonic loss induced by diphenyltin in rats. **Reproductive Toxicology**, v. 16, p. 309–317, 2002.

FELIZZOLA, J. F. Especificação de Compostos Butílicos de Estanho em Sedimentos Superficiais da Baía de Todos os Santos. Dissertação (Mestrado em Química)- Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro, 2005.

FENT, K. Organotin compounds in municipal wastewater and sewage sludge: contamination, fate in treatment process and ecotoxicological consequences. **The Science of the Total Environment**, 185: 151-159. 1996.

FEIGE, J. N.; GELMAN, L.; ROSSI, D.; ZOETE, V.; METIVIER, R.; TUDOR, C.; ANGHEL, S. I.; GROSDIDIER, A.; LATHION, C.; ENGELBORGHES, Y.; MICHIELIN, O.; WAHLI, W.; DESVERGNE, B. The endocrine disruptor monoethyl-hexyl-phthalate is a selective peroxisome proliferator-activated receptor gamma modulator that

promotes adipogenesis. **Journal of Biological Chemistry**, 282, 19152–19166. 2007.

GADD, G. M. Microbial interactions with tributyltin compounds: detoxification, accumulation, and environmental fate. **Science of the Total Environment**, v. 258, p. 119-127, 2000.

GRACELI, J. B.; SENA, G. C.; LOPES, P. F.; ZAMPROGNO, G. C.; DA COSTA, M. B.; GODOI, A. F.; DOS SANTOS, D. M.; DE MARCHI, M. R.; DOS SANTOS FERNANDEZ, M. A. Organotins: A review of their reproductive toxicity, biochemistry, and environmental fate. **Reproductive Toxicology**, v. 36, p. 40-52, 2012.

GLUCKMAN, P. D.; HANSON, M. A.; BEEDLE, A. S.; RAUBENHEIMER, D. Fetal and neonatal pathways to obesity. **Frontiers of Hormone Research**, 36:61–72. 2008.

GROTE, K.; STAHLSCHMIDT, B.; TALSNESS, C. E.; GERICKE, C.; APPEL, K. E.; CHAHOUD, I. Effects of organotin compounds on pubertal male rats. **Toxicology**, v. 202, p. 145–158, 2004.

GROTE, K.; ANDRADE, A. J.; GRANDE, S. W.; KURIYAMA, S. N.; TALSNESS, C. E.; APPEL, K. E.; CHAHOUD, I. Effects of peripubertal exposure to triphenyltin on female sexual development of the rat. **Toxicology**, v. 222, p. 17–24, 2006.

GRUN, F.; BLUMBERG, B. Environmental obesogens: organotins and endocrine disruption via nuclear receptor signaling. **Endocrinology**, 147(Suppl 6):S50–S55. 2006.

GRUN, F.; WATANABE, H.; ZAMANIAN, Z.; MAEDA, L.; ARIMA, K.; CUBACHA, R.; GARDINER, D. M.; KANNO, J.; IGUCHI, T.; BLUMBERG, B. Endocrine disrupting organotin compounds are potent inducers of adipogenesis in vertebrates. **Molecular Endocrinology**, 20:2141–2155, 2006.



GRÜN, F.; BLUMBERG, B. Perturbed nuclear receptor signaling by environmental obesogens as emerging factors in the obesity crisis. **Review in Endocrine Metabolic Disorders**, 8 (2), 161–171, 2007.

GUARD, H. B.; COBERT, A. B.; COLEMAN, W. M. Methylation of trimethyltin compounds by estuarine sediments. **Science**. v.213, p. 70-771, 1981.

GUMY, C.; CHANDSAWANGBHUWANA, C.; DZYAKANCHUK, A. A.; KRATSCHMAR, D. V.; BAKER, M. E.; ODERMATT, A. Dibutyltin disrupts glucocorticoid receptor function and impairs glucocorticoid-induced suppression of cytokine production. **PLoS One**, 3(10):3545. 2008.

GUERRE-MILLO, M. Adipose tissue hormones. **Journal Endocrinology Investigation**, 25, 855–861. 2002.

HEIDRICH, D. D.; STECKELBROECK, S.; KLINGMÜLLER, D. Inhibition of human cytochrome P450 aromatase activity by butyltins. **Steroids**, v. 66, p. 763–769, 2001.

HEINE, P. A.; TAYLOR, J. A.; IWAMOTO, G. A.; LUBAHN, D. B.; COOKE, P. S. Increased adipose tissue in male and female estrogen receptor-alpha knockout mice. **Proceedings of the National Academy Science**, U.S.A. 97 (23), 12729–12734, 2000.

HOCH, M. Organotin compounds in the environment- an overview. **Applied Geochemistry**, v.16, p.719-743, 2001.

HOMMA, H.; KURACHI, H.; NISHIO, Y.; TAKEDA, T.; YAMAMOTO, T.; ADACHI, K.; MORISHIGE, K.; OHMICH, M.; MATSUZAWA, Y.; MURATA, Y. Estrogen suppresses transcription of lipoprotein lipase gene. Existence of a unique estrogen response element on the lipoprotein lipase promoter. **The Journal of Biology and Chemistry**, 275:11404–11411, 2000.

HORIGUCHI, T. Masculinization of female gastropod mollusks induced by organotin compounds, focusing on mechanism of actions of tributyltin and triphenyltin for development of imposex. **Environmental Science**, 13(2):77–87. 2006.

IGUCHI, T.; KATSU, Y. Commonality in signaling of endocrine disruption from snail to human. **Bioscience Journal**, 58, 1061–1067, 2008.

INADERA, H.; SHIMOMURA, A. Environmental chemical tributyltin augments adipocyte differentiation. **Toxicology Letters**, 159 (3):226–34. 2005.

IMO. **Sistemas anti-incrustantes: hacia una solucion no tóxica** [on line]. London: International Maritime Organization. 1999. Disponível em: [http://www.imo.org/blast/blastDataHelper.asp?data\\_id=2319&filename=Antifoulingspanish.pdf](http://www.imo.org/blast/blastDataHelper.asp?data_id=2319&filename=Antifoulingspanish.pdf). Acessado em: 08 de abril de 2013.

IPCS Environmental Health Criteria 116 – Tributyltin Compounds. WHO, Geneva, 273 pp. 1990.

KANAYAMA, T.; KOBAYASHI, N.; MAMIYA, S.; NAKANISHI, T.; NISHIKAWA, J. Organotin compounds promote adipocyte differentiation as agonists of the peroxisome proliferator-activated receptor gamma/ retinoid X receptor pathway. **Molecular Pharmacology**, 67(3):766–74. 2005.

KANNAN, K.; GROVE, R. A.; SENTHILKUMAR, K.; HENNY, C. J.; GIESY, J. P. Butyltin compounds in river otters (*Lutra canadensis*) from the northwestern United States. **Archives of Environmental Contamination Toxicology**, 36 (4), 462–468. 1999.

KERSHAW, E. E.; FLIER, J. S. Adipose tissue as an endocrine organ. **The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, 89, 2548–2556. 2004.

KIRCHNER, S.; KIEU, T.; CHOW, C.; CASEY, S.; BLUMBERG, B. Prenatal exposure to the environmental obsogen tributyltin predisposes multipotent stem cells to become adipocytes. **Molecular Endocrinology**, v. 24, p. 526-539, 2010.

KISHTA, O.; ADEEKO, A.; LI, D.; LUU, T.; BRAWER, J. R.; MORALES, C.; HERMO, L.; ROBAIRE, B.; HALES, B. F.; BARTHELEMY, J.; CYR, D. G.; TRASLER, J. M. *In utero* exposure to tributyltin chloride differentially alters male and female fetal gonad morphology and gene expression profiles in the Sprague-Dawley rat. **Reproductive Toxicology**, v. 23, p. 1–11, 2007.

KORACH, K. S. Estrogen receptor knock-out mice: molecular and endocrine phenotypes. **Journal of the Society for Gynecologic Investigation**, 7 (1 Suppl), S16–17. 2000.

KOVALCHUCK, O.; KOVALCHUCK, I.; ARKIPOV, A.; TELYUK, P.; HOHN, B.; KOVALCHUCK, L. The *Allium cepa* chromosome aberration test realibly measures genotoxicity of soils of inhabited areas in Ukraine contaminated by the Chernobyl accident. **Mutation Research**, v. 415, p. 47-57, 1998.

KRAJNC, E. I.; WESTER, P. W.; LOEBER, J. G.; VAN LEEUWEN, F. X.; VOS, J. G.; ET AL. Toxicity of bis(tri-n-butyltin)oxide in the rat. I. Short-term effects on general parameters and on the endocrine and lymphoid systems. **Toxicology and Applied Pharmacology**, 75: 363–386. 1984.

JANER, G.; NAVARRO, J. C.; PORTE, C. Exposure to TBT increases accumulation of lipids and alters fatty acid homeostasis in the ramshorn snail *Marisa cornuarietis*. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology and Pharmacology**, v. 146, p. 368-374, 2007.

LANGSTON, W. J.; POPE, N. D. Determinants of TBT Adsorption and Desorption in Estuarine Sediments. **Marine Pollution Bulletin**. v.31, n1-3, p.32-43, 1995.

LEE, C. C.; HSIEH, C. Y.; TIEN, C. J. Factors influencing organotin distribution in different marine environmental compartments, and their potencial health risk. **Chemosphere**. v.65, n.4, p.547-559, 2006.

LISBÔA, P. C.; CURTY, F. H.; MOREIRA, R. M.; OLIVEIRA, K. J.; PAZOS-MOURA, C. C. Sex steroids modulate rat anterior pituitary and liver iodothyronine deiodinase activities. **Hormone and metabolic research**, v. 33, p. 523-535, 2001.

LIU, L. L.; CHEN, S. J.; PENG, W. Y.; HUNG, J. J. Organotin concentrations in three intertidal neogastropods from the coastal waters of Taiwan. **Environmental Pollution**, v. 98, p. 113-118, 1997.

LOWRY, O. H.; ROSENBROUGH, N. J.; FARR, A. L.; RANDALL, R. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **The Journal of Biological Chemistry** v. 193, p. 265-275, 1951.

LUDGERO-CORREIA, A.; AGUILA, M. B.; MANDARIM-DE-LACERDA, C. A.; FARIA, T. S. Effects of high-fat diet on plasma lipids, adiposity, and inflammatory markers in ovariectomized C57BL/6 mice. **Nutrition**, 28(3): 316-23. 2012.

LUIJTEN, J. G. A. Applications and Biological Effects of Organotin Compounds. IN: SAWYER, A. K., (ed). Organotin Compounds. **New York: Dekker**, v.3, p.931-974, 1987.

MACLAREN, R.; CUI, W.; CIANFLONE, K. Adipokines and the immune system: an adipocentric view. **Advances in Experimental Medicinal Biology**, 632, 1–21. 2008.

MARON-GUTIERREZ, T.; CASTIGLIONE, R. C.; XISTO D. G.; OLIVEIRA, M. G.; CRUZ, F. F.; PEÇANHA, R.; CARREIRA-JUNIOR, H.; ORNELLAS, D. S.; ET AL. Bone marrow-derived mononuclear cell therapy attenuates silica-induced lung fibrosis. **European Respiratory Journal**, 37(5):1217-25. 2011.

MASUNO, H.; IWANAMI, J.; KIDANI, T.; SAKAYAMA, K.; HONDA, K.; Bisphenol a accelerates terminal differentiation of 3T3-L1 cells into adipocytes through the phosphatidylinositol 3-kinase pathway. **Toxicological Sciences** 84, 319–327. 2005.

MASUNO, H.; KIDANI, T.; SEKIYA, K.; SAKAYAMA, K.; SHIOSAKA, T.; YAMAMOTO, H.; HONDA, K. Bisphenol A in combination with insulin can accelerate the conversion of 3T3-L1 fibroblasts to adipocytes. **The Journal of Lipid Research**, 43, 676–684. 2002.

MASUNO, H.; OKAMOTO, S.; IWANAMI, J.; HONDA, K.; SHIOSAKA, T.; KIDANI, T.; SAKAYAMA, K.; YAMAMOTO, H.; Effect of 4-nonylphenol on cell proliferation and adipocyte formation in cultures of fully differentiated 3T3-L1 cells. **Toxicological Sciences** 75, 314–320. 2003.

MATTHIESSEN, P.; WALDOCK, R.; THAIN, J. E.; WAITE, M. E.; SCROPE-HOWE, S. Changes in periwinkle (*Littorina littorea*) populations following the ban on TBT-based antifoulings on small boats in the United Kingdom. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 30, p. 180–194, 1995.

MATTHIESSEN, P.; GIBBS, P. E. Critical appraisal of the evidence for tributyltin-mediated endocrine disruption in mollusks. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 17, p. 37–43, 1998.

MACLAREN, R.; CUI, W.; CIANFLONE, K., Adipokines and the immune system: an adipocentric view. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, 632, 1–21. 2008.

MENG, P.; LIN, J.; LIU L. Aquatic organotin pollution in Taiwan. **Journal of Environmental Management**, v. 90, p. 8–15, 2009.

MONGET, P.; CHABROLLE, C.; DUPONT, J. Adipose tissue, nutrition and reproduction: **Acad. Natl. Med.** 192 (4), 637–647 discussion 647–648. 2008.

MOYSÉS, M. R.; BARKER, L. A.; CABRAL, A. M. Sex hormone modulation of serotonin-induced coronary vasodilation in isolated heart. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 34, p. 949-958, 2001.

MU, Y. M.; YANASE, T.; NISHI, Y.; TAKAYANAGI, R.; GOTO, K.; NAWATA, H. Combined treatment with specific ligands for PPARgamma:RXR nuclear receptor system markedly inhibits the expression of cytochrome P450arom in human granulosa cancer cells. **Molecular and Cellular Endocrinol**, 181(1–2):239–48, 2001.

MURATA, Y.; ROBERTSON, K. M.; JONES, M. E.; Simpson, E. R. Effect of estrogen deficiency in the male: the ArKO mouse model. **Molecular and Cellular Endocrinology**, 193 (1–2), 7–12. 2002.

NADAL, A.; ALONSO-MAGDALENA, P.; RIPOLL, C.; FUENTES, E. Disentangling the molecular mechanisms of action of endogenous and environmental estrogens. **Pflugers Archiv**. 449 (4), 335–343. 2005.

NAAZ, A.; ZAKROCZYMSKI, M.; HEINE, P.; TAYLOR J.; SAUNDERS P.; LUBAHN D.; COOKE, P. S. Effect of ovariectomy on adipose tissue of mice in the absence of estrogen receptor  $\alpha$  (ER $\alpha$ ): a potential role for estrogen receptor  $\beta$  (ER $\beta$ ). **Hormone and Metabolic Research**, 34:758-63. 2001.

NAKANISHI, T.; KOHROKI, J.; SUZUKI, S.; ISHIZAKI, J.; HIROMORI, Y.; TAKASUGA, S.; ITOH, N.; WATANABE, Y.; UTOGUCHI, N.; TANAKA, K. Trialkyltin compounds enhance human CG secretion and aromatase activity in human placental choriocarcinoma cells. **The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 87, p. 2830–2837, 2002.

NAKANISHI, T.; NISHIKAWA, J. I.; HIROMORI, Y.; YOKOYAMA, H.; KOYANAGI, M.; TAKASUGA, S.; ISHIZAKI, J. I.; WATANABE, M.; ISA, S. I.; UTOGUCHI, N.; ITOH, N.; KONO, Y.; NISHIHARA, T.; TANAKA, K. Trialkyltin compounds bind retinoid X receptor to alter human placental endocrine functions. **Molecular Endocrinology**, 19:2502–2516, 2005.

NEWBOLD, R. R.; PADILLA-BANKS, E.; JEFFERSON, W. N. Environmental estrogens and obesity. **Molecular and Cellular Endocrinology**, 304:84-9, 2009.

OBERDORSTER, E.; MCCLELLAN-GREEN, P. Mechanisms of imposex induction in the mud snail, *Ilyanassa obsoleta*: TBT as a neurotoxin and aromatase inhibitor. **Marine Environmental Research**, 54:715–718, 2002.

OBERDORSTER, E.; RITTSCHOF, D.; LEBLANC, G. A. Alteration of [14C]-testosterone metabolism after chronic exposure of *Daphnia magna* to tributyltin. **Archive of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 34, p. 21–25, 1998.

OHHIRA, S.; WATANABE, M.; MATSUI, H. Metabolism of tributyltin and triphenyltin by rat, hamster and human hepatic microsomes. **Archives of Toxicology**, v. 77, p. 138-144. 2003.

OEHLMANN, J.; BAUER, B.; MINCHIN, D.; SCHULTE-OEHLMANN, U.; FIORONI P.; MARKERT, B. Imposex in *Nucella lapillus* and intersex in *Littorina littorea*: interspecific comparison of two TBT-induced effects and their geographical uniformity. **Hydrobiologia**, v. 378, p.199–213, 1998.

OLIVEIRA, R. C.; SANTELLI, R. E. Occurrence and chemical speciation analysis of organotin compounds in the environment: A review. **Talanta**, v. 82, p. 9–24, 2010.

OMAE, I. Organotin antifouling paints and their alternatives. **Applied Organometallic Chemistry**, 17: 81-105,2003.

OHHIRA, S.; WATANABE, M.; MATSUI, H. Metabolism of tributyltin and triphenyltin by rat, hamster and human hepatic microsomes. **Archives of toxicology**, 77: 138–144.2003.

OMURA, M.; OGATA, R.; KUBO, K.; SHIMASAKI, Y.; AOU, S.; OSHIMA, Y.; TANAKA, A.; HIRATA, M.; MAKITA, Y.; INOUE, N. Two-generation reproductive toxicity study of tributyltin chloride in male rats. **Toxicology Science**, v. 64, p. 224–232, 2001.

PALLOTTINI, V.; BULZOMI, P.; GALLUZZO, P.; MARTINI, C.; MARINO, M. Estrogen regulation of adipose tissue functions: involvement of estrogen receptor isoforms. **Infectious Disorders - Drug Targets**, 8 (1), 52–60, 2008.

PEDERSEN, S. B.; HANSEN, P. S.; LUND, S.; ANDERSEN, PH.; ODGAARD, A.; RICHELSEN, B. Identification of oestrogen receptors and oestrogen receptor mRNA in human adipose tissue. **European Journal of Clinical Investigation**, 26:262-9. 1996.

PEDERSEN, S. B.; BORGLUM, J. D.; ERIKSEN, E. F.; RICHELSEN, B. Nuclear estradiolbinding in rat adipocytes. Regional variations and regulatory influence of hormones. **Biochimica et Biophysica Acta**, 1093:80–86, 1991.

PEDERSEN, S. B.; BRUUN, J. M.; HUBE, F.; KRISTENSEN, K.; HAUNER, H.; RICHELSEN, B. Demonstration of estrogen receptor subtypes  $\alpha$  and  $\beta$  in human adipose tissue: influences of adipose cell differentiation and fat depot localization. **Molecular and Cellular Endocrinology**, Aug 20;182(1):27-37. 2001.

PENZA, M.; JEREMIC, M.; MARRAZZO, E.; MAGGI, A.; CIANA, P.; RANDO, G.; et al. The environmental chemical tributyltin chloride (TBT) shows both estrogenic and adipogenic activities in mice which might depend on the exposure dose. **Toxicology and Applied Pharmacology**, 255:65-75, 2011.

PLETSCH, A. P.; BERETTA, M.; TAVARES, T. M. Distribuição espacial de compostos orgânicos de estanho em sedimentos costeiros em *Phallusia nigra* da Baía de todos os Santos e litoral Norte da Bahia – Brasil. **Química Nova**. v. 33, n.2, p.451-457, 2010.

PHILBERT, M. A.; BILLINGSLEY, M. L.; REUHL, K. R. Mechanisms of injury in the central nervous system. **Toxicology Pathology**, 28:43–53, 2000.

PINOCHET, H.; TESSINI, C.; BRAVO, M.; QUIROZ, W.; DE GREGORI, I. Butyltin compounds and their relation with organic matter in marine sediments from San Vicente Bay-Chile. **Environmental Monitoring and Assessment**, v. 155, p. 341–353, 2009.

PODRATZ, P. L.; DELGADO FILHO, V. S.; LOPES, P. F. I.; SENA, G. C.; MATSUMOTO, S. T.; SAMOTO, V. Y.; TAKIYA, C. M.; DE CASTRO MIGUEL, E.; SILVA, I. V.; GRACELI, J. B. Tributyltin impairs the reproductive cycle in female rats. **Journal of Toxicology and Environmental Health**, A, v. 75, p. 1035-46, 2012.

PHILBERT, M. A.; BILLINGSLEY, M. L.; REUHL, K. R. Mechanisms of injury in the central nervous system. **Toxicology Pathology**, 28:43–53, 2000.

RANTAKOKKO, P.; TURUNEN, A.; VERKASALO, P. K.; KIVIRANTA, H.; MÄNNISTÖ, S.; VARTIAINEN, T. Blood levels of organotin compounds and their relation to fish consumption in Finland. **Science of the Total Environment**, 399 (1–3), 90–95. 2008.



RUDEL, H. Case study: bioavailability of tin and tin compounds. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v.56, p.180-189, 2003.

SAITOH, M.; YANASE, T.; MORINAGA, H.; TANABE, M.; MU, Y.; NISHI, Y.; NOMURA, M.; OKABE, T.; GOTO, K.; TAKAYANAGI, R.; NAWATA, H. Tributyltin or Triphenyltin inhibits aromatase activity in the human granulosa-like tumor cell line KGN. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 289, p. 198–204, 2001.

SAKURAI, K.; KAWAZUMA, M.; ADACHI, T.; HARIGAYA, T.; SAITO, Y.; HASHIMOTO, N.; MORI, C.; Bisphenol A affects glucose transport in mouse 3T3-F442A adipocytes. **British Journal of Pharmacology**, 141, 209–214. 2004.

SCHULTE-OEHLMANN, U.; BETTIN, C.; FIORONI, P.; OEHLMANN, J.; STROBEN, E. *Marisa cornuarietis* (Gastropoda, Prosobranchia): a potential TBT bioindicators for freshwater environments. **Ecotoxicology**, v. 4, p. 372-384, 1995.

dos SANTOS R. L.; PODRATZ, P. L.; SENA, G. C.; DELGADO FILHO, V. S.; LOPES, P. F. I.; GONÇALVES, W. L.; ALVES, L. M.; SAMOTO, V. Y.; TAKIYA, C. M.; de CASTRO MIGUEL, E.; MOYSÉS, M. R.; GRACELI, J. B. Tributyltin impairs the coronary vasodilation induced by 17 $\beta$ -estradiol in isolated rat heart. **Journal Toxicology Environmental Health A**, v. 75, p. 948-59, 2012.

SWENNEN, C.; RUTTANADAKUL, N.; ARDSEUNGNERN, S.; SINGH, H. R.; MENSINK, B. P.; TEN HALLERS-TJABBES, C. C. Imposex in sublittoral and littoral gastropods from the Gulf of Thailand and strait of Malacca in relation to shipping. **Environmental Technology**, v. 18, p. 1245-1254, 1997.

TABB, M.; BLUMBERG, B. New modes of action for endocrine-disrupting chemicals. **Molecular Endocrinology**, v.20, p. 475–82, 2006.

TAKAHASHI, S.; TANABE, S.; TAKEUCHI, I.; MIYAZAKI, N. Distribution and specific bioaccumulation of butyltin compounds in a marine ecosystem. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, 37 (1), 50–61. 1999.

UENO, S.; KASHIMOTO, T.; SUSA, N.; ISHII, M.; CHIBA, T.; et al. Comparison of hepatotoxicity and metabolism of butyltin compounds in the liver of mice, rats and guinea pigs. **Archives of toxicology**, 77: 173–181. 2003

UGERRE, T. A.; ABREU, G. R.; SAMPAIO, K. N.; CABRAL, A. M.; BISSOLI, N. S. The cardiopulmonary reflexes of spontaneously hypertensive rats are normalized after regression of left ventricular hypertrophy and hypertension. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 33, p. 589-594, 2000.

UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY (USEPA). **Endocrine Disruptor Screening and Testing Advisory Committee**. Washington DC. 2000. Disponível em: <<http://www.epa.gov/scipoly/oscpendo/edspoverview/edstac.htm>>. Acesso em: 18 de fevereiro de 2013.

VOS, J. G.; DYBING, E.; GREIM, H. A.; LADEFOGED, O.; LAMBRE, C.; TARAZONA, J. V.; BRANDT, I.; VETHAACK, A. D. Health effects of endocrine-disrupting chemicals on wildlife, with special reference to the European situation. **Critical Reviews in Toxicology**, v. 30, p. 71–133, 2000.

WADA, O.; MANABE, S.; IWAI, H.; ARAKAWA, Y. Recent progress in study of analytical methods, toxicity, metabolism and health effects of organotin compounds. **Sangyo Igaku**, v. 24, p. 24-54, 1982.

ZUO, Z.; CHEN, S.; WU, T.; ZHANG, J.; SU, Y.; CHEN, Y.; WANG, C. Tributyltin causes obesity and hepatic steatosis in male mice. **Environmental Toxicology**, 26(1):79-85. 2009.